

INDICE DE LA MEMORIA

Resumen	6
Resum.....	6
Abstract.....	7
GLOSARIO	8
Capítulo 1: Introducción.....	11
1.1. Objetivos generales	11
1.2. Objetivos concretos	11
Capítulo 2: contenido.....	12
Antecedentes y estado actual del tema	12
2.1. Cerebro	13
2.1.1. Neuronas	14
2.1.2. Dentrines - Cuerpo Neuronal – Axón	14
2.1.3. El impulso nervioso	15
2.1.4. Neurotransmisores	15
2.2. Receptores de glutamato.....	16
2.3. La densidad postsináptica.....	16
2.4. Hierro.....	17
2.4.1. El hierro como elemento esencial y en condiciones fisiológicas.....	17
2.4.2. Vías de absorción intestinal de hierro	18
2.4.3. Transporte de hierro	20
2.4.4. El receptor de transferrina y la incorporación celular de hierro.....	20
2.4.5. El receptor de transferrina y la homeostasis celular de hierro	22
2.4.6. Receptor 2 de transferrina	23
2.4.7. Vía de incorporación de hierro independiente de transferrina	24
2.4.8. Desórdenes del metabolismo de hierro	25
2.4.9. Deficiencia del hierro	25
2.4.10. Sobrecarga de hierro	26
2.5. Radicales libres y Especies Reactivas	27
2.5.1. Definición y clasificación.....	27
2.5.2. Principales fuentes de Radicales Libres	28
2.5.3. Fuentes endógenas de Radicales Libres	28
2.5.4. Fuentes exógenas de Radicales Libres	29

2.5.5.	Daños producidos por los Radicales Libres	29
2.6.	Estrés oxidativo.	32
2.6.1.	Definición.....	32
2.6.2.	Efectos químicos y biológicos	32
2.6.3.	Producción y consumo de oxidantes.....	33
2.6.4.	Antioxidantes como suplementos.....	34
2.6.5.	Catalizadores metálicos.....	34
2.6.6.	Catalizadores redox no metálicos.....	34
2.6.7.	Defensa inmune.....	35
2.7.	Glutamato y ecotoxicidad	35
2.8.	Fisiopatología cerebral del ictus.....	35
2.8.1.	El complejo ferritina-hierro como potenciador del daño cerebral isquémico.	36
Capítulo 3: Materiales y métodos.....		38
3.1.	Métodos.....	38
3.1.1.	Cultivos primarios de Neuronas	38
3.1.2.	Ensayo Actividad lactato deshidrogenasa (LDH).....	41
3.1.3.	Determinación de hierro Libre en fluidos biológicos	42
3.1.4.	Determinación de hierro Total en Cultivos.....	42
3.1.5.	Determinación de Proteína.....	43
3.2.	Preparación de Reactivos.....	44
3.2.1.	Preparación del Tampón Lisis	44
3.2.2.	Preparación del glutámico 50μM	44
3.2.3.	Preparación de la dilución HCl 10mM tenemos 6N	44
3.2.4.	Preparación del reactivo detección de hierro	44
3.2.5.	Preparación de la mezcla fresca.....	44
3.2.6.	Preparación del tampón lisis o Dilución NaOH 50mM	45
3.3.	Materiales e instalaciones	45
Capítulo 4: Resultados		46
4.1.	Toma de muestra Cultivos Primarios	46
4.1.1.	Medio de cultivo.....	46
4.1.2.	Lisado.....	46
4.2.	Ensayo Actividad lactato deshidrogenasa (LDH).....	47
4.3.	Determinación de hierro Libre en fluidos biológicos	50
4.4.	Determinación de hierro Total en Cultivos.....	53

Capítulo 5: Conclusiones	56
Capítulo 6: Presupuesto	57
6.1. Introducción	57
Capítulo 7: Bibliografía.....	iError!Marcador no definido.
7.1. Referencias bibliográficas	iError!Marcador no definido.
7.2. Bibliografía de consulta	iError!Marcador no definido.
Anexos a la memoria	

RESUMEN

El objetivo de este proyecto, es conocer la implicación del complejo de ferritina-hierro en el estrés oxidativo iniciado por el glutamato que ocurre en el infarto cerebral.

Usaremos un modelo de cultivos primarios de neuronas corticales de rata. En primer lugar se incuban las células con glutamato para obtener cultivos en los que las neuronas presenten las características bioquímicas propias que se producen en los infartos cerebrales. Tras esto, se analiza el efecto neurotóxico provocado por la ferritina añadida en el medio de cultivo, determinando su efecto sobre el estrés oxidativo. La muerte celular se determina mediante el método de la Lactato deshidrogenasa y la concentración de hierro mediante espectrofotometría.

Siguiendo este procedimiento, se concluye que el hierro está implicado en los mecanismos moleculares que causan la muerte neuronal.

RESUM

L'objectiu d'aquest projecte es conèixer la implicació del complex ferritina-ferro en l'estrès oxidatiu iniciat per el glutamat que té lloc quan es produeix un infart cerebral.

Utilitzarem un model de cultius de neurones corticals de rata. En primer lloc s'incuben les cel·les amb glutamat per obtenir cultius en els que les neurones presentin les característiques bioquímiques pròpies que es produeixen d'infart cerebral. Tot seguit s'analitza l'efecte neurotòxic provocat per la ferritina afegida en el medi de cultiu, determinant el seu efecte sobre l'estrès oxidatiu. La mort cerebral es determina mitjançant el mètode de la Lactato deshidrogenasa i la concentració de ferro mitjançant espectrofotometria.

Seguint aquest procediment, conclouem que el ferro està implicat en els mecanismes moleculars que causen la mort neuronal.

ABSTRACT

The objective of this project is to ascertain the involvement of ferritin-iron complex in the oxidative stress initiated by glutamate that occurs in stroke.

We use a model of primary cell cultures of rat cortical neurons. First, cells were incubated with glutamate to obtain cultures in which neurons exhibit the proper biochemical characteristics that occur in strokes. Later, the neurotoxic effect caused by the ferritin added to the culture medium was examined, determining its effect on oxidative stress. Cell death is determined by the lactate dehydrogenase method and the iron concentration by spectrophotometry.

Through this procedure, it is concluded that iron is involved in the molecular mechanisms that cause neuronal death

GLOSARIO

Accidentes cerebrovasculares (ACV): Cuando resulta un taponamiento de las arterias, que puede inducir a la embolia cardiogénica.

Apoptosis: Se puede considerar como una muerte celular "programada". La apoptosis es un evento celular natural el cual también puede ser inducido por condiciones patológicas.

Astrocito: Células con forma estrellada que suministran soporte físico y nutricional a las neuronas: 1) limpian los "escombros" cerebrales; 2) llevan nutrientes a la neurona; 3) mantienen a las neuronas en su lugar; 4) digieren partes de neuronas muertas; 5) regulan el contenido del espacio extracelular.

Cadena Respiratoria Mitocondrial: La cadena de transporte de electrones es una serie de transportadores de electrones que se encuentran en la membrana plasmática de bacterias, en la membrana interna mitocondrial en las membranas tilacoidales, que median reacciones bioquímicas que producen adenosina trifosfato (ATP), que es el compuesto energético que utilizan los seres vivos.

Células gliales: Controlan, fundamentalmente, el microambiente celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento.

Citocina: Son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares.

Citotóxico: Término usado para describe todo aquello que daña las células.

Daño tisular: Muerte celular se produce por la falta de oxigenación en los tejidos.

Duodeno: Es la primera parte del intestino delgado y se localiza entre el estómago y la parte media del intestino delgado o yeyuno.

Electroencefalografía (EEG): Es un estudio mediante el cual se mide la actividad eléctrica en el cerebro, lo que se denomina ondas cerebrales.

Ergastoplasma: Sinónimo de retículo endoplasmático rugoso. Organela celular compuesta por ribosomas adheridos a la membrana externa de perfiles de retículo endoplasmático. Está muy desarrollado en células con gran síntesis proteica (hepatocitos, células plasmáticas, células exocrinas del páncreas, etc.).

Fosforilación Oxidativa: Es la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato.

Glutamato: El L-Glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante del sistema nervioso central de los mamíferos actuando a través de canales iónicos operados por ligandos (receptores ionotrópicos) y a través de receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos)

El grupo hemo: Es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina, presente en los eritrocitos de la sangre, donde su función principal es la de almacenar y transportar oxígeno molecular de los pulmones hacia los tejidos y dióxido de carbono desde los tejidos periféricos hacia los pulmones. Los grupos hemo son los responsables del color rojo de la sangre.

Infarto cerebral isquémico: Se debe a un trastorno circulatorio cerebral que produce una necrosis tisular y una alteración permanente de las funciones cerebrales correspondientes.

Ictus: Trastorno a nivel circulatorio cerebral, caracterizado por su brusca aparición, y que implica una alteración del flujo sanguíneo.

Isquemia: Se produce cuando la llegada de sangre es deficitaria, y por lo tanto falta de oxígeno, a un área del cerebro. En consecuencia, se produce una lesión más o menos importante dependiendo de la localización y el tamaño de la zona afectada y del tiempo durante el cual habido falta de oxígeno en las células.

Líquido Cefalorraquídeo: Líquido que circula por los espacios huecos del cerebro y la médula espinal y entre dos de las meninges (las capas finas de tejido que cubren y protegen el cerebro y la médula espinal). Posee una (Función mecánica) que actúa como amortiguador para proteger al sistema nervioso, y también compensa los cambios del volumen sanguíneo intracraneal, actúa como un termorregulador y en menor grado interviene en la nutrición del tejido nervioso.

Microtúbulos: Son un componente del citoesqueleto que tienen un papel organizador interno crucial en todas las células eucariotas, mientras a otras también les permiten moverse. Tienen numerosas funciones, como establecer la disposición espacial de determinados orgánulos, forman un sistema de raíles mediante el cual se pueden transportar vesículas o macromoléculas entre compartimentos celulares, son imprescindibles para la división celular puesto que forman el uso mitótico y son esenciales para la estructura y función de los cilios y de los flagelos.

Mitocondrias: La mitocondria es un orgánulo de gran tamaño cuya función principal es llevar a cabo la respiración celular aeróbica, que tiene como fin la producción de energía en forma de ATP. Sólo se encuentra en células eucariotas. Es el único orgánulo, junto con cloroplastos de células vegetales, que presenta un sistema genético propio. Mutaciones en el ADN mitocondrial producen múltiples enfermedades.

Necrosis: Conjunto de procesos irreversibles, mediante el cual se produce la degeneración celular luego de la muerte.

Neurofilamentos: Tipo de filamento intermedio de unos 7 nm de espesor, presente en el citoplasma de las neuronas. Está en contacto con los neurotúbulos, por medio de puentes de unión y conecta la membrana celular, la mitocondria y los polirribosomas. Interviene en el mantenimiento de la estructura neuronal y en el transporte axónico.

Neurotransmisor: Es aquella molécula liberada por las neuronas al espacio sináptico donde ejerce su función sobre otras neuronas u otras células (células musculares o glandulares). Son elementos clave en la transmisión de los estímulos nerviosos.

Plasma: Parte clara, amarillenta y líquida de la sangre que transporta los glóbulos. Las proteínas que forman los coágulos de sangre están en el plasma.

Plasticidad sináptica: Propiedad que emerge de la naturaleza y funcionamiento de las neuronas cuando éstas establecen comunicación, y que modula la percepción de los estímulos con el medio, tanto los que entran como los que salen

Peroxidación lipídica: Es la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre.

Sinapsis: Es el punto de conexión funcional entre dos neuronas adyacentes y constituye el lenguaje básico del sistema nervioso.

Sistema Mononuclear Fagocítico: Sistema funcional del cuerpo que participa principalmente en la defensa Frente a infecciones y en la eliminación de los productos de degradación de las Células

Transferrina: Sustancia en estudio para el tratamiento de tumores cerebrales. La transferrina-CRM107 se elabora al unir toxina de difteria a la transferrina, una proteína que se une a las células de crecimiento rápido, como las células tumorales. La toxina de difteria luego destruye las células tumorales. La transferrina-CRM107 es un tipo de inmunotoxina.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivos generales

El objetivo central es asociar de cómo el complejo ferritina-hierro está implicado en el deterioro neurológico isquémico, con especial énfasis en su implicación en la evolución hacia la recuperación funcional o hacia la muerte celular de las neuronas de la zona de penumbra.

1.2. Objetivos concretos

Caracterizar la neurotoxicidad producida por el glutamato en cultivos de neuronas en función de la concentración y tiempo de exposición. En las condiciones que dan lugar a neuronas con características metabólicas como las producidas en los infartos cerebrales, determinaremos la viabilidad y la alteración de la actividad metabólica de las neuronas frente a concentraciones diferentes de ferritina-hierro en el medio de cultivo.

CAPÍTULO 2:

CONTENIDO

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son la tercera causa de muerte y la primera de invalidez en los países industrializados. Aproximadamente el 20% de los pacientes fallecen durante el primer mes y un tercio de los que sobreviven pasados 6 primeros meses, necesitan ayuda. En la mayoría de los casos, los ACV son debidos a una interrupción, transitoria o permanente, del flujo de sangre en una determinada área del cerebro que tiene como consecuencia la falta de oxígeno y glucosa en el tejido del área afectada. El resultado de la isquemia es el infarto cerebral o ictus. La lesión cerebral causada por el ictus es un proceso dinámico de duración variable, caracterizado por la presencia en la región cerebral infartada de un centro necrótico en el que todas las neuronas mueren rápidamente un área circundante, "zona de penumbra", en el que las neuronas están dañadas pero mantienen el metabolismo energético parcialmente conservado. La experiencia clínica muestra que en unos pacientes las neuronas de la zona de penumbra recuperan las propiedades bioquímicas y fisiológicas y el paciente recuperan las funciones neurológicas afectadas, mientras que en otros paciente las neuronas de la zona de penumbra no se recuperan y mueren y el paciente experimenta un mayor deterioro neurológico que puede llevar a la muerte. La evolución de las neuronas de la zona de penumbra hacia la recuperación de su actividad metabólica normal o hacia la necrosis es determinante en el resultado final del ictus.

En los últimos años ha habido un avance importante en el conocimiento de la fisiopatología del ictus pero aún desconocemos las causas que determinan que la zona de penumbra evolucione en un sentido u otro. El conocimiento de las mismas y los mecanismos implicados será determinante para el diseño de estrategias terapéuticas adecuadas.

2.1. Cerebro

El cerebro es un tejido complejo que no se parece a nada de lo que conocemos en el universo, pero como tal está compuesto de células. Se trata de células muy especializadas denominadas neuronas.

El cerebro humano tiene un peso aproximadamente 1.350 gramos en donde abarcan del orden de 10^{11} (cien mil millones) de neuronas.

La organización general del cerebro puede verse explicada mediante un bosquejo simplista, en su entrada hay grupos receptores, neuronas modificadas y especializadas en transformar en señales eléctricas las distintas formas de información que inciden sobre ellas procedentes del mundo exterior. Algunos receptores responden a la luz otros a las sustancias químicas (gusto y olfato), y otros aun a las deformaciones mecánicas (tacto y oído). Los receptores entran en contacto con un primer conjunto de neuronas, que a su vez sintonizan con otros, y así sucesivamente. En cada paso a lo largo del camino, los axones se ramifican para establecer contacto con unas cuantas neuronas de las que siguen en la secuencia, cada una de las cuales recibe varios axones que convergen sobre ellas. Cada célula receptora integra los impulsos excitadores o inhibidores que convergen en ella procedentes de células de orden inferior. Más pronto o más tarde, después de varios pasos, los axones nerviosos terminan sobre células glandulares o musculares, que son las salidas del sistema nervioso.

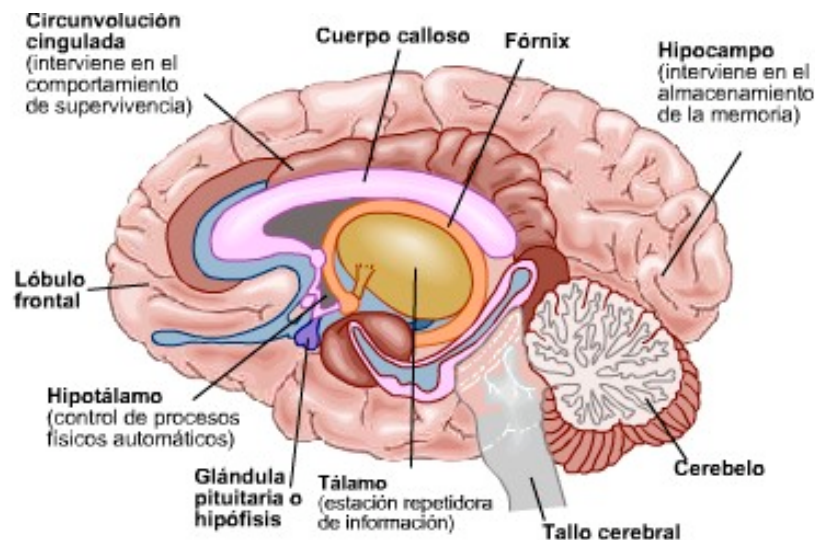


Figura1: Partes del cerebro humano

2.1.1. *Neuronas*

Las neuronas son las células especializadas del Sistema Nervioso, tal que, han perdido la capacidad de realizar otras funciones y son incapaces de dividirse, de nutrirse por sí mismas o de defenderse. Por este motivo hay una serie de CÉLULAS ACOMPAÑANTES que nutren, protegen y dan soporte a las neuronas (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, etc.).

La forma de las neuronas es muy compleja. Presentan unas prolongaciones más o menos delgadas, denominadas DENDRITAS y, normalmente, otra de mayor tamaño, llamada AXÓN o FIBRA NERVIOSA. Un conjunto de axones o dendritas forman un NERVIO, que suele estar recubierto de tejido conjuntivo. Las dendritas son vías de entrada de los impulsos nerviosos a las neuronas y los axones son vías de salida.

Las neuronas son células sintetizadoras de proteínas, con un alto gasto de energía metabólica, ya que se caracterizan por:

- Presentar formas complejas y una gran área de superficie de membrana celular, a nivel de la cuál debe mantener un gradiente electroquímico importante entre el intra y el extracelular
- Secretar distintos tipos de productos a nivel de sus terminales axónicos
- Requerir un recambio contante de sus distintos organelos y componentes moleculares ya que su vida suele ser muy larga.

2.1.2. *Dentrines - Cuerpo Neuronal – Axón*

Las dendritas constituyen la parte de la neurona que se especializa en recibir excitación, que puede ser de estímulos en el ambiente o de otra célula. El axón es la parte que se especializa en distribuir o conducir la excitación desde la zona dendrítica.

Las dendritas nacen como prolongaciones numerosas y ramificadas desde el cuerpo celular. A lo largo de las dendritas existen las espinas dendríticas, pequeñas prolongaciones citoplasmáticas, que son sitios de sinapsis. El citoplasma de las dendritas contiene mitocondrias, vesículas membranosas, microtúbulos y neurofilamentos.

El axón es de forma cilíndrica y nace desde el cono axónico que carece de ergastoplasma y ribosomas. El citoplasma del axón (axoplasma) contiene mitocondrias, vesículas, neurofilamentos y microtúbulos paralelos. Su principal función es la conducción del impulso nervioso. Se ramifica extensamente sólo en su región terminal (telodendrón) la que actúa como la porción efectora de la neurona, ya que así cada terminal axónico puede hacer así sinapsis con varias neuronas o células efectoras.

2.1.3. *El impulso nervioso*

No es más que una transmisión, un desplazamiento de cargas eléctricas por la membrana neuronal. Este impulso es la base de todas las funciones nerviosas. Debido a esto, y empleando instrumentos especiales de medición, se puede detectar la actividad nerviosa en forma de pequeñas corrientes eléctricas, mediante la electroencefalografía.

Cuando el impulso nervioso llega al final del axón de una neurona tiene que "saltar" hasta las dendritas de la siguiente neurona porque las neuronas no están pegadas unas a otras, sino que hay un pequeño espacio entre una y otra, llamado ESPACIO SINÁPTICO. El "salto" del impulso nervioso se hace por medio de unas moléculas químicas llamadas NEUROTRANSMISORES que salen de la primera neurona, cuando llega el impulso nervioso, y llegan a la siguiente neurona provocando un nuevo impulso eléctrico.

Los neurotransmisores son unas de las sustancias químicas más importantes que hay en nuestro cuerpo.

Existen algunas sustancias químicas que pueden sustituir a las verdaderas neuronas, produciendo falsos impulsos nerviosos, tal como hacen algunas drogas alucinógenas, como el LSD o el peyote; Otras drogas lo que hacen es retardar el Sistema Nervioso, bloquearlo, ejemplo de ello son los opiáceos como la heroína, y otras sustancias que excitan el Sistema Nervioso y lo activan, como sucede con la cocaína o las drogas sintéticas, o con sustancias de uso más habitual, como el café.

2.1.4. *Neurotransmisores*

Un neurotransmisor es una molécula liberada por las neuronas al espacio sináptico. A estas neuronas se les llama pre-sinápticas y contienen gran cantidad de neurotransmisor en vesículas sinápticas. Una vez liberado al espacio sináptico el neurotransmisor difunde y llega a la membrana postsináptica donde ejerce su función al unirse a su receptor. Los receptores para neurotransmisores pueden encontrarse en otras neuronas, en células musculares o en células glandulares. Las células que portan los receptores se llaman células post-sinápticas. Los receptores de estas células pueden ser canales iónicos abiertos por ligando o receptores acoplados a proteínas G.

La función del neurotransmisor es transmitir una señal desde la célula pre-sináptica a la célula post-sináptica. Su efecto puede ser excitatorio si tiende a despolarizar la membrana o inhibitorio si la repolariza. Después de actuar es degradado o recapturado por la célula pre-sináptica rápidamente.

Los neurotransmisores pueden clasificarse según su tamaño en:

- Neurotransmisores de pequeño tamaño: aminoácidos (glicina, ácido glutámico, ácido aspártico), derivados de aminoácidos (GABA, histamina, serotonina y catecolaminas) acetilcolina , ATP.
- Neuropeptidos, compuestos por más de 3 aminoácidos: somatostatina, vasopresina, oxitocina. Muchos de estos neuropeptidos actúan también como hormonas, conociéndose como neurohormonas.

Los defectos en la síntesis de los neurotransmisores, liberación, degradación o función de estos, están involucrados en la patógena de una gran cantidad de enfermedades neurológicas, musculares y psiquiátricas.

2.2. Receptores de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso central y lleva a cabo sus funciones a través de dos tipos diferentes de receptores, los receptores metabotrópicos de glutamato y los receptores ionotrópicos de glutamato. Solo haremos mención a estos últimos.

Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos permeables a cationes, aunque la permeabilidad relativa a Na^+ o Ca_2^+ depende de la familia y de las subunidades que componen el receptor en cada caso. Los receptores están formados por cuatro o cinco subunidades específicas para cada uno de los tres subgrupos de que se componen estos receptores.

Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres tipos atendiendo a criterios farmacológicos:

- Los receptores AMPA, que responden a α -amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y provocan fundamentalmente la entrada de iones Na^+ al interior celular, aunque, en algunos casos, también pueden aumentar la conductancia de Ca_2^+ .
- Los receptores KA tienen como agonista principal el kainato (KA) y su estimulación provoca la entrada de Na^+ al interior celular (Brorson et al, 1992).
- Finalmente, los receptores NMDA, llamados así porque responden a N-metil-D-aspartato (NMDA), provocan el aumento de la permeabilidad de la membrana a iones Na^+ y, en menor grado, a iones Ca_2^+ (Flatman et al, 1983; Pumain et al, 1986).

2.3. La densidad postsináptica

Las sinapsis químicas en el sistema nervioso central son contactos neurona-neurona asimétricos altamente especializados. El lado presináptico del contacto se caracteriza por la acumulación de vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores. El lado postsináptico está constituido por la densidad postsináptica (PSD), una estructura electrodensa altamente especializada y subyacente a la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias (Figura 2).

La densidad postsináptica contiene todo tipo de moléculas que están involucradas en la transducción de señal así como en la plasticidad sináptica. La alta densidad proteica de este compartimento subcelular precisa de un elevado grado de estructuración que se consigue gracias a la presencia de una serie de scaffolding proteins.

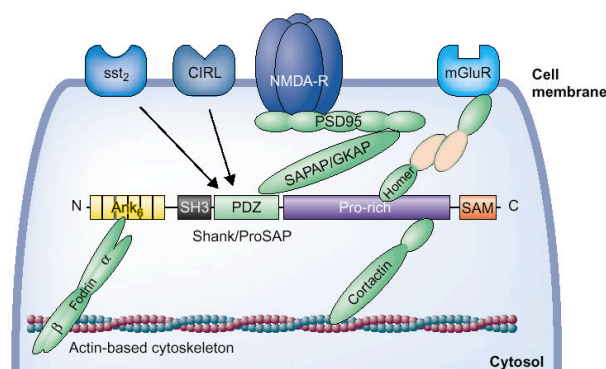


Figura 2. Ejemplo de densidad postsináptica de una sinapsis glutamatérgica. La proteína Shank constituye el elemento central de la densidad postsináptica que organiza la estructura a la cual se unen varios receptores, el NMDA, sst2, CIRL o mGlu. También cabe destacar el doble anclaje del complejo al citoesqueleto de actina.

2.4. Hierro

2.4.1. El hierro como elemento esencial y en condiciones fisiológicas

El hierro es un elemento esencial para todos los organismos vivos. En la primera etapa de la evolución de la vida, los seres primitivos lo utilizaban como parte de su sistema de generación de energía, existiendo en su estado ferroso debido al escaso oxígeno ambiental.

Cuando la concentración de oxígeno aumentó, predominaron las formas oxidadas, poco solubles y los organismos tuvieron que sintetizar moléculas que tuvieran capacidad de unir hierro para poder así aprovechar mejor su presencia. En los animales vertebrados esta función es realizada por las proteínas transferrina (Tf) y ferritina, quienes son, respectivamente, las responsables del transporte y almacenamiento de hierro. Estas proteínas unen el metal muy estrechamente para evitar la formación de productos hidrolíticos insolubles, pero como el proceso es reversible, el elemento se encuentra disponible ante la demanda celular.

La combinación del hierro con una proteína evita, además, su pérdida vía filtración glomerular. En soluciones acuosas, el hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico). Esta propiedad lo hace capaz de participar en reacciones que abarcan gran parte de la bioquímica, incluyendo aquellas que controlan el flujo de electrones a través de rutas bioenergéticas, la síntesis de ADN y el aporte de oxígeno a los tejidos. Entre las hemoproteínas que utilizan hierro como cofactor se encuentran las que participan en el metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), en la transferencia de electrones (citocromos) y en el transporte de oxígeno (hemoglobina).

El hierro en el organismo se encuentra formando parte de dos compartimentos:

- uno funcional, que incluye los diversos compuestos celulares que contienen o requieren hierro,
- y otro de depósito, el cual constituye la reserva corporal del metal.

El transporte de hierro unido a la Tf plasmática facilita el intercambio del metal entre ambos compartimientos.

El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema monocito-macrófago del bazo, el hígado y la médula ósea.

En condiciones fisiológicas el hierro está unido a una proteína ya que su presencia aislada, como en los casos de intoxicación por el metal, produce daños graves en los tejidos. Esta toxicidad se debe a la habilidad del hierro libre de generar, en conjunción con el oxígeno, radicales hidroxilos que pueden causar peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares. Por esta razón, la absorción, concentración y estado redox de este metal, deben ser regulados cuidadosamente: si la cantidad de hierro presente es escasa, se produce anemia y si se encuentra en exceso, causa daño en los órganos por siderosis.

2.4.2. Vías de absorción intestinal de hierro

La circulación del hierro entre los compartimientos de depósito y utilización constituye un ciclo muy eficiente y prácticamente cerrado. Dado que sólo una pequeña proporción del metal es excretada, la necesidad diaria de incorporación de hierro en un individuo es muy baja. Por lo tanto, sólo una pequeña proporción del total del metal ingerido es absorbida (aproximadamente el 10%).

Aunque el hierro puede ser absorbido a lo largo de todo el intestino, este proceso es más eficiente en el duodeno.

El hierro dietario se encuentra principalmente en estado férrico o como hierro hémico, mientras que el incorporado a través de productos farmacológicos usualmente está presente como sal ferrosa. El Fe^{3+} es insoluble en soluciones con pH mayor a 3, por lo que, en el estómago, se forman complejos solubles del metal que aumentan su disponibilidad para ser absorbido en el duodeno. Por otra parte, en el lumen del intestino se forman cantidades variables de iones ferrosos como consecuencia de la reducción del hierro férrico por agentes dietarios (por ejemplo, ácido ascórbico). En consecuencia, ambos iones (ferroso y férrico) pueden presentarse ante las células intestinales.

Los diferentes mecanismos descriptos para la absorción de hierro, esquematizados en la figura X, se resumen a continuación:

1. Los iones férricos pueden ser absorbidos vía una proteína de membrana. Luego, son transferidos a una proteína (chaperona mobilferrina).
2. La absorción de los iones ferrosos es facilitada por un transportador de metales divalentes DMT1 (divalent metal transporter 1), Por otra parte, otra proteína DcytB (duodenal cytochrome b), reduce los iones férricos dietarios, los cuales pueden entonces ser incorporados también vía DMT1.
3. El grupo hemo es liberado de mioglobina y hemoglobina como consecuencia de la digestión proteolítica llevada a cabo por enzimas pancreáticas.
4. Posteriormente, es incorporado por las células absortivas del intestino delgado. El proceso de transporte es mediado por una proteína específica. Dentro de la célula, el hemo es degradado por la hemooxigenasa, liberándose de esta manera el hierro inorgánico de la estructura tetrapirrólica.

5. Una vez en el interior del enterocito, el metal absorbido a través de cualquiera de las vías descritas es convertido a su estado ferroso, paso que es realizado por un gran complejo proteico citoplasmático llamado paraferritina. El mismo incluye proteínas como β_3 -integrina, mobilferrina, flavin monooxigenasa y β_2 -microglobulina y utiliza una cadena de transporte de electrones con energía derivada de NADPH para llevar a cabo la reducción del hierro absorbido.
6. Posteriormente, los iones ferrosos pueden ser almacenados en la ferritina o alcanzar la membrana basolateral del enterocito donde son conducidos por la proteína transportadora transmembrana ferroportina (Fpn), también llamada Ireg1 (iron-regulated transporter 1) o MTP1 (metal transporter protein 1). La proteína de membrana hefaestina o la ceruloplasmina plasmática promueven la oxidación del hierro facilitando de esta manera su incorporación a la apotransferrina circulante.

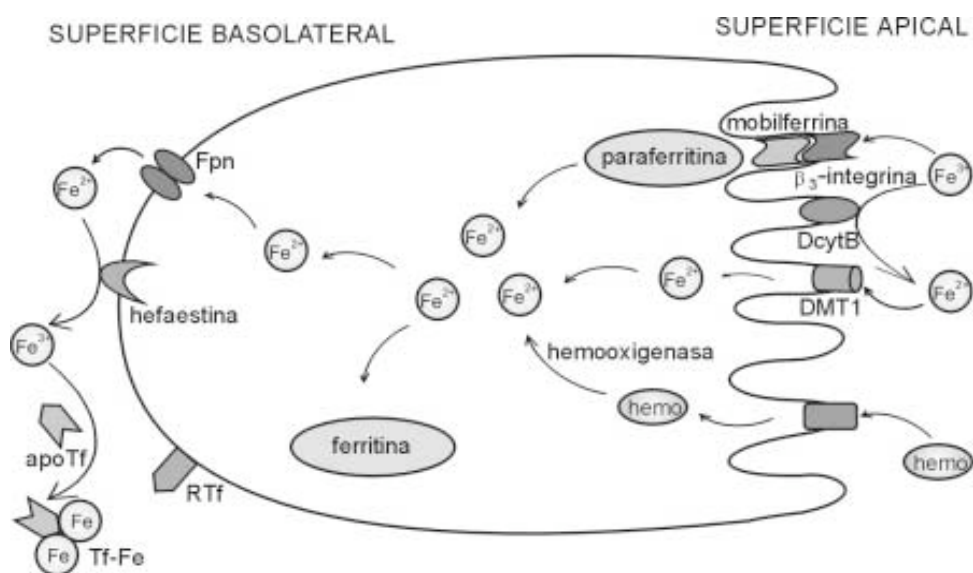


Figura 3. Diferentes mecanismos descritos para la absorción de hierro.

Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción de este metal esencial, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal. La membrana basolateral del enterocito expresa receptores para Tf que permiten la entrada del hierro transportado por esta proteína. El metal incorporado en este proceso «informa» a la célula sobre el estatus férrico del organismo, induciendo la regulación negativa de su captación vía DMT1 e integrinamobilferrina.

2.4.3. *Transporte de hierro*

La concentración de hierro en plasma de individuos adultos normales oscila alrededor de 1,5 µg/mL. Está predominantemente unido a Tf y en pequeña proporción a albúmina o a especies de bajo peso molecular. La cantidad de hierro requerida diariamente es captada por la Tf en las células del lumen intestinal y en los lugares de degradación de la hemoglobina (sistema monocito-macrófago). Esta proteína transporta y cede el catión en los sitios de síntesis de hemoglobina y de enzimas que contienen hierro.

La Tf sérica o siderofilina es una proteína plasmática que se halla también en otros fluidos de los vertebrados, tales como líquido cefalorraquídeo, leche y semen. Es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa, constituida por una única cadena polipeptídica a la que se unen hidratos de carbono formando dos ramas idénticas y casi simétricas. Su ligando natural es el hierro trivalente al que une con alta afinidad. Además, esta proteína puede unir una variedad de iones multivalentes. La Tf es capaz de unir un ión férrico a cada uno de sus dos sitios, los cuales poseen 40% de homología pero difieren en sus propiedades químicas, cinéticas, espectroscópicas y termodinámicas, siendo el dominio de mayor afinidad el ubicado en la región C-terminal.

Para que la unión con hierro pueda establecerse, se requiere la unión simultánea de un anión. Por cada ión férrico que se incorpora se liga concomitantemente un anión carbonato o bicarbonato y se liberan, aproximadamente, tres protones. La existencia de una cooperatividad recíproca entre la unión del ión metálico y la del anión indica que la Tf tiene un estricto requerimiento del anión sinergista para facilitar la unión con el hierro. La función del anión sería la de actuar como ligando «reforzador» de la unión entre la proteína y el metal. A pH fisiológico, en presencia de ión bicarbonato y en ausencia de agentes complejantes, el hierro se une a cualquiera de los dos sitios de la Tf humana. Luego, factores cinéticos gobiernan la distribución del metal entre los dos sitios.

Normalmente, 70% de la Tf plasmática no está saturada con el metal esencial y, por lo tanto, la reserva total de esta proteína actúa como amortiguador frente a grandes cantidades de hierro absorbido o liberado, las que, de otra manera, resultarían tóxicas cuando el metal está libre en su estado oxidado. En situaciones de saturación de la capacidad de transporte de Tf, el hierro puede unirse a otros ligandos, como citrato, constituyendo el llamado pool de hierro no unido a Tf (NTBI, non-transferrin bound iron).

2.4.4. *El receptor de transferrina y la incorporación celular de hierro*

El número y estabilidad de los receptores de transferrina (RTf) en la superficie celular son los primeros determinantes de la captación de hierro. Estos receptores no sólo son importantes para facilitar el acceso del metal esencial a la célula sino que cumplen, además, un rol crítico en la liberación del hierro del complejo con Tf en el interior celular.

El RTf es una glicoproteína homodimérica transmembrana de aproximadamente 190 kDa. Los monómeros se encuentran ligados entre sí por dos puentes disulfuro y cada molécula de RTf posee capacidad para unir dos moléculas de Tf.

El hierro transportado por Tf ingresa a las células a través de un proceso de endocitosis mediada por RTf. El primer paso es la unión de Tf al receptor en la

membrana. A pH 7,4 el RTf posee muy baja afinidad por la apoTf, intermedia por la Tf monoférrica y cuatro veces más elevada por la Tf diférrica. El cambio de cargas resultante de la unión del hierro y el bicarbonato con liberación de protones, estaría relacionado con esta afinidad diferencial de los receptores por la Tf según su grado de saturación con hierro.

Los RTf se encuentran concentrados en fosas (invaginaciones de la membrana plasmática) revestidas internamente por la proteína clatrina. Una vez formado el complejo Tf-RTf, el proceso de invaginación se completa, dando origen a una vesícula revestida que es transportada junto con el complejo ligando-receptor al interior celular.

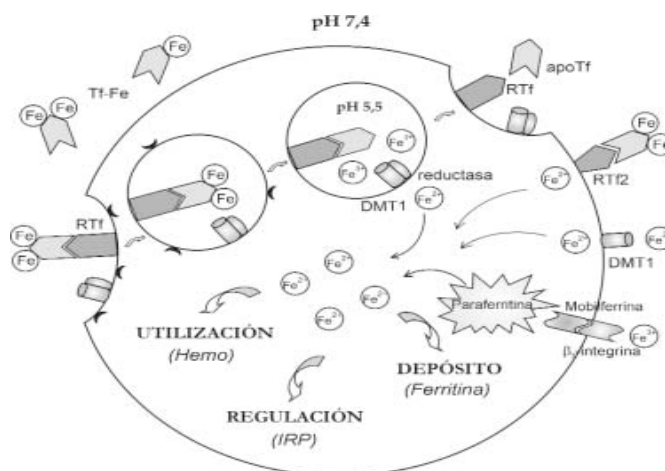


Figura 4: Esquema gráfico de la incorporación celular de hierro

Una vez que la clatrina es removida, la vesícula resultante se fusiona con un endosoma.

El pH del interior del compartimiento endosomal oscila alrededor de 5,5 debido a la acción de una bomba de protones dependiente de ATP presente en su membrana, la cual bombea protones desde el citosol al interior del endosoma. A este pH, el hierro es liberado del complejo Tf-RTf como ión férrico. La unión cooperativa metal-bicarbonato no sólo es importante para la asociación del hierro a la Tf sino también, para su liberación. La unión anión-Tf, relativamente lábil, parece proveer un mecanismo para la remoción fisiológica del hierro. El carbonato se desaloja primero y, por ello, la unión metal-Tf es fácilmente desestabilizada, produciéndose la liberación del hierro mientras que la proteína permanece intacta. Posteriormente, el metal es reducido por una ferri-reductasa endosomal y transportado al citoplasma por el transportador de cationes divalentes DMT1 (DCT1, Nramp2).

En contraste con la mayoría de los ligandos que se disocian de su receptor y entran en una ruta de fusión con lisosoma y degradación, la elevada afinidad del RTf por apoTf a pH ácido los mantiene unidos.

El complejo apoTf-RTf es transportado intacto hacia la membrana plasmática donde, al tomar contacto nuevamente con el medio extracelular de pH neutro, se disocia. La apo proteína queda entonces disponible para captar nuevamente hierro y comenzar otro ciclo de transporte e internalización.

Una vez en el citoplasma, el ión ferroso incorporado puede seguir tres destinos:

a) *pool de utilización*, es decir, las proteínas celulares que requieren hierro

- b) *pool de almacenamiento*, constituido primariamente por ferritina y hemosiderina
- c) *pool regulatorio*, el cual incluye a las proteínas encargadas de detectar variaciones en los niveles intracelulares del metal.

2.4.5. El receptor de transferrina y la homeostasis celular de hierro

Los requerimientos de hierro varían según las condiciones celulares particulares en un momento dado. Por ejemplo, las células que se encuentran en una etapa activa de división o aquellas que tienen requerimientos metabólicos especiales, tales como la producción de hemoglobina, necesitan mayor aporte del metal.

Para mantener la homeostasis de hierro en células de mamíferos es necesario el balance coordinado entre su captación, utilización y almacenamiento intracelular. Ello explica que la expresión de las proteínas clave involucradas en el metabolismo del hierro sea controlada post-transcripcionalmente por los niveles intracelulares del metal. El mecanismo de regulación es mediado por interacciones específicas entre secuencias IRE (iron responsive elements) localizadas en los respectivos ARNm y proteínas citoplasmáticas denominadas IRP (iron regulatory proteins).

Las IRE, secuencias de nucleótidos filogenéticamente conservadas, están constituidas por 28 bases que forman una estructura secundaria en forma de horquilla (hairpin o stem-loop), conformación que les permite interactuar con las IRP.

Estas secuencias IRE están localizadas en las regiones no codificantes o no traducidas (UTRs) situadas en los extremos 5' o 3' de los ARNm y, dependiendo de la posición, difiere el efecto que ocasiona su interacción con las IRP. Las IRE situadas en la región UTR 5' actúan regulando la unión del mensajero al ribosoma o sea, controlando la iniciación de la traducción y aquellas ubicadas en la región UTR 3', modulan la estabilidad o degradación del ARNm por acción de endorribonucleasas.

En células de mamíferos han sido identificadas dos proteínas IRP (IRP1 e IRP2) que actúan como sensores del contenido celular de hierro.

La IRP1 es una proteína bifuncional que puede actuar como aconitasa citoplasmática o unirse a secuencias IRE. Posee un cluster [4Fe-4S] en su sitio activo y puede convertirse reversiblemente en su forma activa [4Fe-4S] o inactiva [3Fe-4S] en respuesta a modificaciones en la disponibilidad de hierro. Bajo condiciones de depleción del metal, la apoIRP1 puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE. Contrariamente, cuando el aporte de hierro aumenta, la IRP1 incorpora un átomo del metal al cluster [4Fe-4S], adoptando una conformación en la cual es incapaz de interactuar con el ARN, pero posee actividad aconitasa. Por lo tanto, las alteraciones en la actividad de la proteína ocurren sin cambios significativos en su concentración.

La IRP2 posee 62% de homología con la IRP1 pero, a diferencia de ella, carece del cluster [4Fe-4S] y no posee actividad aconitasa. Tiene capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE localizadas en los mensajeros. En su región N-terminal contiene una secuencia rica en cisteína que es responsable de la degradación de la proteína vía proteasoma cuando los niveles intracelulares de hierro son altos. Por el contrario, cuando el aporte del metal disminuye, se produce la síntesis de novo de la IRP2.

Por lo que la síntesis de las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro es regulada a través de la interacción IRE-IRP (Figura 5).

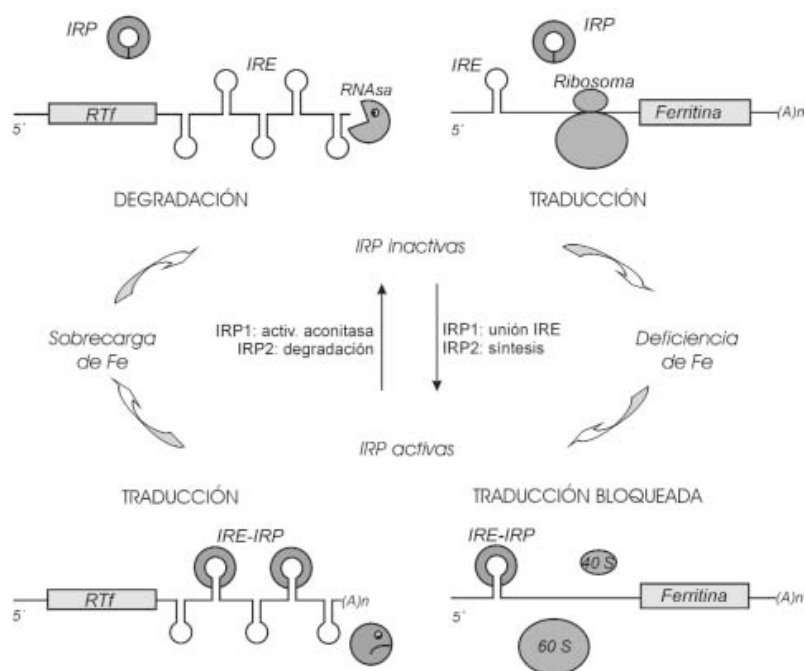


Figura 5: Síntesis de las proteínas involucrada en el metabolismo del hierro

En la región UTR 3' del ARNm del RTf, hay cinco secuencias IRE altamente conservadas. En este caso, la interacción IRE-IRP protege al mensajero de la degradación, permitiendo, de esta manera, su traducción con la consecuente síntesis del receptor.

La UTR 5' de los ARNm de las cadenas liviana y pesada de la ferritina y de la enzima -aminolevulino sintetasa (ALAS), contienen una única secuencia IRE. En ambos casos, la interacción de las IRP con esta secuencia bloquea la traducción.

De la manera descrita, el sistema IRE-IRP permite a las células regular en forma coordinada la biosíntesis de las proteínas involucradas en la captación (RTf), utilización (ALAS) y almacenamiento (ferritina) de hierro, durante las variaciones fisiológicas de su biodisponibilidad. En un estado de depleción de hierro, el objetivo de la célula es incrementar la captación del metal y disminuir su utilización o almacenamiento.

Las IRP activas se unen a las secuencias IRE, aumentando la síntesis de RTf mientras que disminuyen la de ferritina y ALAS. Inversamente, cuando los niveles de hierro son altos, el metal es utilizado o almacenado y su incorporación debe ser disminuida. Las IRP se disocian de las IRE y, como consecuencia, el ARNm del RTf es degradado y la síntesis de ferritina y ALAS aumenta.

2.4.6. Receptor 2 de transferrina

Existe un segundo receptor de Tf, denominado RTf2, cuya participación en la homeostasis del hierro es menos conocida. La secuencia de aminoácidos de este receptor, deducida a partir de su ARNm, indica que el gen RTf2 codifica para una

proteína de membrana que posee 45% de identidad con el RTf en su dominio extracelular.

También se han encontrado otras similitudes entre el RTf2 y RTf: ambos receptores pueden unir Tf a nivel de la membrana y mediar la incorporación celular de hierro. Además, interactúan con la Tf de una manera dependiente del pH: la holoTf se une a los receptores a pH neutro o levemente alcalino, mientras que la apoTf lo hace sólo a pH ácido. Sin embargo, la afinidad del RTf2 por la holoTf es alrededor de 25 veces menor que la del RTf.

La secuencia consenso de internalización del RTf2 no es idéntica a la del RTf. Esto sugiere distintos mecanismos de endocitosis y, probablemente, un procesamiento intracelular diferente.

Las regiones no codificantes del ARNm del RTf2 no poseen estructuras similares a las secuencias IRE.

Esto explicaría que, a diferencia de lo que sucede con el RTf, la expresión del RTf2 no es afectada por los niveles de disponibilidad de hierro. En cambio, ha sido sugerido que podría ser regulada por el ciclo celular.

Las diferencias en la distribución tisular de ambos receptores, así como también los distintos perfiles de expresión en células hepáticas y eritroides, sugieren funciones fisiológicas diferentes. Las evidencias disponibles hasta el momento permiten postular que el RTf2 estaría involucrado en el metabolismo del hierro, la función del hepatocito y el proceso de diferenciación eritroide.

Según los antecedentes mencionados, las células podrían controlar la captación del metal esencial mediante dos receptores para Tf diferentes: el RTf, de mayor afinidad, cuya expresión es regulada por los niveles celulares de hierro y el RTf2, de baja afinidad, el cual se expresaría dependiendo del ciclo celular o del estatus proliferativo de las células.

2.4.7. Vía de incorporación de hierro independiente de transferrina

El mecanismo de incorporación de hierro mediado por Tf ha sido considerado durante mucho tiempo como la única vía de ingreso del metal a las células. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de un sistema de captación de hierro independiente de Tf.

Las evidencias más contundentes derivan de trabajos realizados en ratones hipotransferrinémicos. Al nacer, los animales homocigotas para esta mutación, poseen concentraciones de Tf en plasma menores que el 1% de los valores normales y exhiben una anemia macrocítica severa. Sin embargo, a pesar de la carencia de Tf, acumulan hierro en tejidos parenquimatosos tales como hígado y páncreas.

Como se ha mencionado, prácticamente todo el hierro plasmático circula unido a Tf y el libre es prácticamente indetectable. En desórdenes caracterizados por la sobrecarga de hierro -como por ejemplo la hemocromatosis hereditaria- los sitios de unión de la proteína al metal se encuentran saturados y, bajo estas condiciones, el nivel de hierro no unido a Tf puede alcanzar concentraciones micromolares. Paralelamente, se han encontrado depósitos masivos del metal en células hepáticas.

En las dos patologías mencionadas, ya sea por carencia (hipotransferrinemia) o por saturación (hemocromatosis hereditaria), la disponibilidad de la apoTf es

insuficiente para cumplir con la distribución de hierro a las células. Por esta razón, el metal circula en plasma en forma de complejos de bajo peso molecular y es removido mediante un sistema de transporte independiente de Tf.

A pesar de que la vía alternativa de captación de hierro ha sido identificada hace más de una década, existe aún discrepancia acerca de cuáles son los mecanismos involucrados, cuál es su regulación, así como también, cuál es su función biológica.

2.4.8. Desórdenes del metabolismo de hierro

El contenido total de hierro de un adulto normal es de aproximadamente 3,5 a 5 g. En individuos con un estado nutricional óptimo, alrededor del 65% se encuentra formando parte de la hemoglobina, el 15% está contenido en la mioglobina y diversas enzimas, el 20% está como hierro de depósito y sólo entre 0,1 y 0,2% se encuentra unido a la Tf circulante. Tal como ya ha sido mencionado, el hierro tiene capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente a través de su interconversión entre las formas Fe^{2+} y Fe^{3+} , propiedad que lo convierte en un compuesto sumamente útil. Sin embargo, este metal también puede provocar daños en los tejidos catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno en radicales libres que pueden dañar las membranas celulares, las proteínas o el ADN. Por lo tanto, la homeostasis de hierro se halla estrictamente controlada, ya que tanto la deficiencia como la sobrecarga de este metal esencial son perjudiciales.

2.4.9. Deficiencia del hierro

La deficiencia de hierro se produce cuando los requerimientos del organismo exceden los aportes. En aquellas situaciones en que existe escaso hierro disponible, se producen limitaciones en la síntesis de compuestos fisiológicamente activos que lo contienen y, por lo tanto, surgen consecuencias deletéreas. Por ejemplo, cuando el hierro incorporado resulta insuficiente para la síntesis de hemoglobina, sobreviene anemia de tipo ferropénico.

Las causas que pueden conducir a la deficiencia de hierro involucran cuatro factores principales: a) pérdida de sangre (uterina en las mujeres, gastrointestinal en ambos sexos); b) dieta deficiente o inadecuada (pobre en hierro o con exceso de inhibidores de la absorción del metal); c) aumento de la demanda (embarazo) y d) mala absorción (patologías gastrointestinales).

En un principio, las necesidades pueden ser cubiertas recurriendo a las reservas de hierro asociado a ferritina y hemosiderina; pero si el balance negativo persiste, dichas reservas terminan por agotarse.

Como respuesta a una importante disminución del pool intracitoplasmático de hierro, se induce el aumento de la expresión de los RTf a través del mecanismo mediado por la interacción IRE-IRP descrito anteriormente.

De esta manera, las células se adecuan para captar el hierro necesario para cubrir sus requerimientos.

2.4.10. Sobrecarga de hierro

Un estado de sobrecarga en el contenido total de hierro resulta de un aporte del metal que excede los requerimientos. Como las necesidades son limitadas y los seres humanos carecen de un mecanismo fisiológico para la excreción del exceso de hierro, un incremento sostenido en su absorción puede, eventualmente, resultar en una acumulación del metal. Como consecuencia, si la capacidad del organismo para llevar a cabo su transporte y almacenamiento es excedida, la toxicidad del metal puede producir daño a distintos órganos e, inclusive, desencadenar la muerte.

Las manifestaciones tóxicas de la sobrecarga de hierro dependen en parte de la magnitud del exceso, de la velocidad de acumulación y de la partición del metal entre sitios de depósito relativamente benignos en los macrófagos y los más perjudiciales en las células parenquimatosas.

Contrariamente a lo que sucede bajo condiciones de deficiencia de hierro, el aumento de la saturación de Tf sérica induce la regulación negativa de la expresión de RTf en células hepáticas y de otros órganos.

Por otra parte, el excedente de hierro que circula en la forma de complejos de bajo peso molecular, induciría el aumento de la captación del metal por la vía independiente de Tf en aquellas células encargadas de la detoxificación del medio, como los macrófagos.

En respuesta a la sobrecarga de hierro, el hígado secreta hepcidina, una hormona proteica que controla los niveles plasmáticos del metal, regulando la absorción de hierro dietario. La unión de hepcidina a la Fpn induce la internalización y posterior degradación de la proteína transportadora. Como consecuencia, disminuye la exportación de hierro desde el enterocito hacia el plasma.

La forma más común de sobrecarga de hierro es la hemocromatosis hereditaria. Los pacientes con este desorden autosómico recesivo absorben regularmente dos o tres veces más hierro dietario que las personas normales. Por lo tanto, la cantidad del metal unido a Tf aumenta, pudiendo alcanzar valores de 50-60% de saturación. El exceso de hierro es depositado en las células parenquimatosas del hígado, corazón, páncreas, glándula pituitaria y paratiroides. Como consecuencia, los pacientes desarrollan hepatomegalia con fibrosis y cirrosis, cardiomiopatías y diversas endocrinopatías como diabetes mellitus, hipopituitarismo, hipogonadismo e hipoparatiroidismo. Curiosamente, esta enfermedad no es causada por un defecto en una proteína involucrada en el transporte de hierro, sino por una anomalía en un regulador del transporte. En 1996 fue identificada la proteína de membrana HFE que se halla mutada en la mayoría de los pacientes con hemocromatosis hereditaria.. Parece ser una molécula regulatoria que influye sobre la eficiencia de la absorción del metal esencial.

HFE forma un heterodímero con la 2-microglobulina, el cual es expresado en la superficie de muchas células. A pH neutro, el heterodímero forma un complejo estable con el RTf, resultando en un cambio conformacional del receptor que provoca modificación de su afinidad por Tf. De esta manera, HFE modularía la captación de hierro unido a Tf desde el plasma hacia los enterocitos de la cripta duodenal y participaría en el mecanismo por el cual dichas células detectan modificaciones de las reservas corporales de hierro.

2.5. Radicales libres y Especies Reactivas

2.5.1. Definición y clasificación

Los Radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquel que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (reactive oxygen species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertible en radicales (la presencia de un "." en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical). De forma análoga existen Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), del cloro (RCIS) y del bromo (RBrS). En la Tabla X se presenta las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), que son los dos grandes grupos de especies reactivas implicados en la biología redox

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) fisiológicas.

	ROS	Símbolos	RNS	Símbolos
Radicales	Anión superóxido	O ₂ ·-	Óxido nítrico	NO·
	Hidroxilo	·OH	Dióxido de nitrógeno	NO ₂ ·
	Alcóxilo	RO·		
	Peróxilo	ROO·		
No Radicales	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Peroxinitrito	ONOO-
	Ácido hipocloroso	HClO	Ácido nitroso	HNO ₂
	Ozono	O ₃	Catión nitrosilo	NO ⁺
	Oxígeno singulete	1ΔO ₂	Anión nitroxilo	NO-
			Peroxinitritos alkilo	ROONO

Debido al propio funcionamiento del metabolismo aeróbico, pequeñas cantidades de ROS se generan constantemente en el organismo, la mayoría a partir de las

cadena de transporte de electrones. Destacan el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el oxígeno singlete ($^1\Delta\text{O}_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

2.5.2. Principales fuentes de Radicales Libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de ROS y RNS que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos (Dreosti, 2000). Aunque la exposición a los ROS procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da de forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida.

2.5.3. Fuentes endógenas de Radicales Libres

Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células:

- a) En la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O

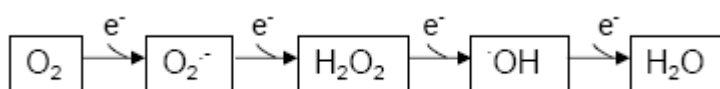


Figura6: Agentes oxidantes derivados del metabolismo normal celular.

- b) Las células fagocíticas (leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo en el que se producen grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, NO^\cdot y OCl^\cdot . Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer.
- c) Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, producen H_2O_2 como subproducto, que es degradado de forma natural por el enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, alguno de los peróxidos escapa a la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.
- d) Las enzimas del complejo Citocromo P450 son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.

2.5.4. Fuentes exógenas de Radicales Libres

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan:

- Los óxidos de nitrógeno (NOx) del humo del tabaco
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (Química de Fenton figura 1)

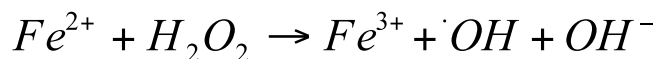


Figura 1: Reacción de Fenton

- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición

Una relación más detallada de los posibles agentes oxidantes exógenos a los que está expuesto nuestro organismo sería:

- Los contaminantes
- las drogas
- las radiaciones
- la dieta si es alta en ácidos grasos poliinsaturados y glucosa
- Iones metálicos : Hierro, Cobre, Cadmio, Níquel, Cromo, Mercurio
- Otros como el tabaco y el ejercicio intenso.

2.5.5. Daños producidos por los Radicales Libres

Cuando el organismo se ve desbordado por un exceso de RS, prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañada. El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis o apoptosis (Figura 6). Es importante destacar que no todas las especies reactivas presentan la misma capacidad de reacción o son igual de reactivas. Ciertos compuestos como el H₂O₂, O₂^{•-} y NO[•], reaccionan de forma relativamente selectiva con sólo ciertas moléculas biológicas *in vivo*, mientras que el radical [•]OH es altamente reactivo, ya que reacciona instantáneamente con cualquier molécula que encuentra. Otra característica que diferencia a los ROS es el sitio donde actúan; los radicales libres reaccionan casi al instante en el lugar de su formación debido a su elevada reactividad, mientras que los ROS no radicalarios, como el H₂O₂, pueden atravesar membranas biológicas y extender así su campo de acción y su posible toxicidad a zonas alejadas de su lugar de formación y durante períodos de tiempo más largos.

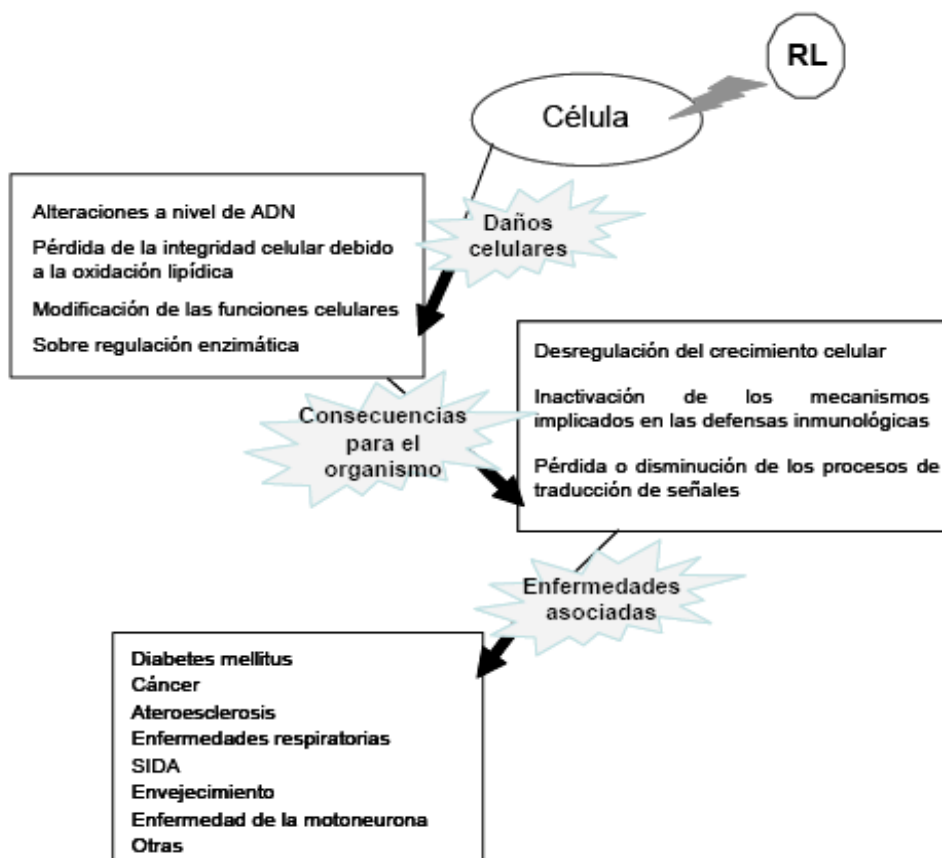


Figura 6: Daños producidos por los radicales libres

Actuación exacta de los Radicales Libres El mecanismo de “ataque” a las estructuras biológicas se inicia cuando el RL le sustrae un átomo de hidrógeno o, alternativamente un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón no apareado del radical en un par de electrones más estable (Figura 7). Dado que desde un punto de vista electroquímico la molécula que pierde el hidrógeno o el electrón se oxida, los RL y RS se conocen como (pro)oxidantes.

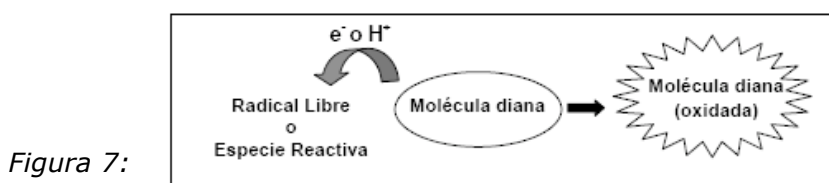


Figura 7:

Mecanismos de ataque de los RL

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación. La reacción de oxidación se inicia cuando el ácido graso diana pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Este radical peroxilo dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y, así sucesivamente en lo que constituye la etapa de propagación. Esta cadena de reacción se conoce como peroxidación lipídica (LPO)

y se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra (Figura 7)

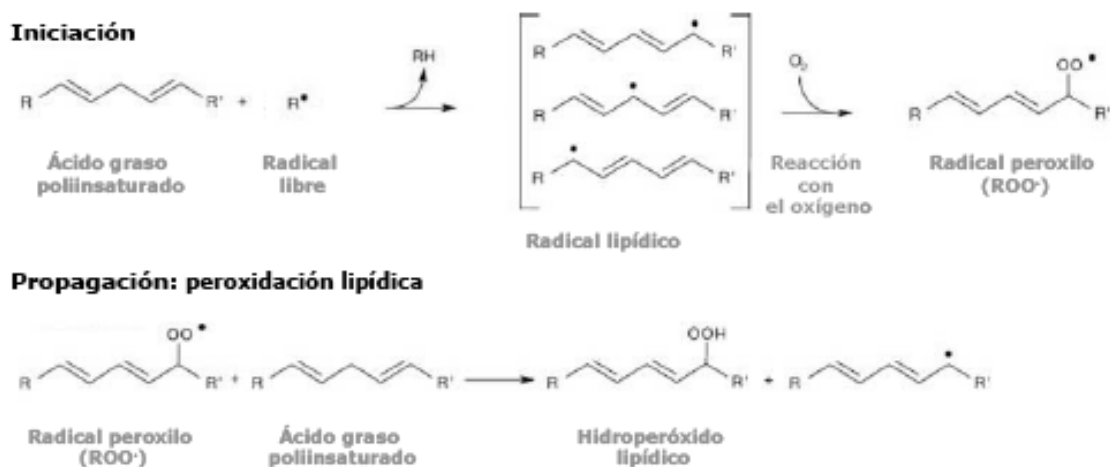


Figura 7: Procesos de peroxidación lipídica iniciada por el radical R

La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones:

1. se consume una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno.
2. se forma un radical relativamente poco reactivo o
3. dos radicales al reaccionar forman un par no radical. Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica se incluyen, entre otros, el 4-hidroxi-2-alquenal y el malondialdehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogénia de varias enfermedades.

1.1.4. Efectos beneficiosos de los Radicales Libres: no podían ser tan malos

A pesar de que los RL son conocidos básicamente por sus efectos dañinos sobre el organismo, se debe puntualizar que la generación de RL no se relaciona siempre con toxicidad y daño, ya que estas moléculas desarrollan funciones fisiológicas cruciales para el correcto funcionamiento del cuerpo humano y, aunque parezca contradictorio, nuestras células necesitan estar rodeadas de un cierto ambiente oxidativo para poder existir y desarrollarse. Los RL participan activamente en diversas funciones celulares como la activación génica, el crecimiento celular, la apoptosis, la modulación de diversas reacciones químicas etc, también, gracias a ellos es posible la relajación muscular y la dilatación de los vasos sanguíneos, actúan en el control de la presión sanguínea, forman parte del mecanismo de defensa llevado a cabo por las células fagocíticas contra agentes infecciosos y participan en el metabolismo de xenobióticos a través de la acción de la Citocromo P450 y en el desarrollo embrionario; por último, se les atribuye un papel relevante como mediadores en la síntesis de otras moléculas, como las prostaglandinas, y como moléculas de señalización tanto en la célula como entre células.

2.6. Estrés oxidativo.

2.6.1. Definición

Estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs

Las especies reactivas del oxígeno y su sistema de detoxificación (versión simplificada). SOD: superóxido dismutasa, GSH-peroxidasa: glutatión peroxidasa. Si este sistema es desbordado, surge una situación de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN

Los síntomas específicos y su reconocimiento son difíciles de detectar por analíticas corrientes. Así que el estrés oxidativo si no se trata, acelera el proceso de envejecimiento y favorece la aparición de envejecimiento precoz, Alzheimer, infartos, colitis ulcerosa, pancreatitis, accidentes cerebrovasculares, determinados tipos de cáncer, etc.

A la permanente producción de radicales libres que dañan estructuras biológicas, el organismo opone la acción de antioxidantes que lo protegen.

Cuando el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se pierde en favor de los primeros, se desencadenan procesos dañinos que se asocian al desarrollo de numerosas enfermedades.

2.6.2. Efectos químicos y biológicos

En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento (cada vez menos negativo) en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis.

Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies de oxígeno reactivo, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. Algunas de las menos reactivas de estas especies (como el superóxido) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en quinonas, especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y

el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desmorone.

Oxidante	Descripción
•O ₂ ⁻ , Anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de O ₂ , formado en muchas reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar Fe ²⁺ de proteínas ferrosulfuradas y de la ferritina. Sufre dismutación para formar H ₂ O ₂ espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de •OH catalizado por metales.
H ₂ O ₂ , peróxido de hidrógeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de •O ₂ ⁻ o por reducción directa de O ₂ . Soluble en lípidos y por ende capaz de difundir por membranas.
•OH, radical hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Extremadamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares.
ROOH, hidroperóxido orgánico	Formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos.
RO•, alcoxi- y ROO•, peroxi-	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Formas lipídicas participan en reacciones de peroxidación de lípidos. Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
HOCl, ácido hipocloroso	Formado a partir de H ₂ O ₂ por la mieloperoxidasa. Soluble en lípidos y altamente reactivo. Rápidamente oxida constituyentes de proteínas, incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina.
OONO-, peroxinitrito	Formado en una rápida reacción entre •O ₂ ⁻ y NO•. Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Protonación forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión homolítica para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

2.6.3. Producción y consumo de oxidantes

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa.

El peróxido de hidrógeno es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas monooxigenasas y oxidasas. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la señalización celular, en un proceso denominado señalización redox. Así, para mantener la homeostasis celular, debe lograrse un equilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y su consumo.

Los antioxidantes celulares enzimáticos son superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otros enzimas con propiedades antioxidantes (aunque esta no es su función primordial) incluyen la paraoxonasa, la glutatión S-transferasa, y la aldehído deshidrogenasa.

El estrés oxidativo contribuye a la lesión tisular después de la irradiación e hipoxia. Desempeña un papel en la cascada isquémica debido a los daños por la reperfusión de oxígeno que sigue a la hipoxia. Esta cascada incluye tanto los accidentes cerebrovasculares como ataques cardíacos.

2.6.4. Antioxidantes como suplementos

El uso de antioxidantes para prevenir enfermedades es controversial.

En un grupo de alto riesgo como los fumadores, altas dosis de beta-caroteno aumentan la tasa de cáncer de pulmón.

En grupos de bajo riesgo, el uso de la vitamina E parece reducir el riesgo de enfermedades cardíacas.

En otras enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer, las pruebas sobre la suplementación con vitamina E arrojan resultados mixtos.

El estrés oxidativo (tal como Denham Harman lo formuló en su teoría de los radicales atamamiento de accidentes cerebrovasculares libres) se cree que también contribuye al proceso de envejecimiento. Aunque hay pruebas favorables que confirman esta idea en organismos modelo como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* las pruebas en mamíferos son menos claras.

2.6.5. Catalizadores metálicos

Metales tales como hierro, cobre, cromo, vanadio y cobalto son capaces de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales y puede producir especies reactivas del oxígeno. Las reacciones más importantes son probablemente la reacción de Fenton y la reacción de Haber-Weiss, en el que se producen radicales hidroxilo de la reducción del hierro y peróxido de hidrógeno. Los radicales hidroxilo pueden dar lugar a modificaciones de los aminoácidos (e.g. la formación de meta-tirosina y orto-tirosina a partir de fenilalanina), hidratos de carbono, iniciar la peroxidación de lípidos, y oxidar nucleobases. La mayoría de las enzimas que producen las especies reactivas del oxígeno contienen uno de estos metales. La presencia de estos metales en los sistemas biológicos de forma no acomplexada (no en una proteína u otro tipo de protección del complejo metálico) puede aumentar significativamente el nivel de estrés oxidativo. En el ser humano la hemocromatosis se asocia con un aumento de los niveles de hierro tisular.

2.6.6. Catalizadores redox no metálicos

Determinados compuestos orgánicos, además de catalizadores redox metálicos también pueden producir especies reactivas del oxígeno. Una de las más importantes son las quinonas. Las quinonas puede hacer un ciclo redox con sus conjugados semiquinonas e hidroquinonas, en algunos casos, catalizando la producción de superóxido desde peróxido de hidrógeno. El estrés oxidativo

generado por el agente reductor ácido úrico puede estar implicado en el síndrome de Lesch-Nyhan, accidentes cerebrovasculares y el síndrome metabólico. Del mismo modo la producción de especies reactivas del oxígeno en presencia de homocisteína en homocisteinuria, así como arteriosclerosis, accidentes cerebrovasculares, y Alzheimer.

2.6.7. *Defensa inmune*

El sistema inmunitario utiliza los letales efectos de los oxidantes haciendo de las especies oxidantes una parte central de su mecanismo para matar a los agentes patógenos; con la producción de los fagocitos activados de ERO y las especies reactivas del nitrógeno. Estos incluyen el superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), y en particular su producto reactivo, peroxinitrito (OONO^-). Aunque el uso de estos compuestos altamente reactivos en la respuesta citotóxica de los fagocitos causa daños a los tejidos huésped, la no especificidad de estos oxidantes es una ventaja, ya que pueden dañar casi cualquier parte de la célula blanco. Esto impide que un agente patógeno escape de esta parte de la respuesta inmunitaria mediante la mutación de un único blanco molecular.

2.7. Glutamato y ecotoxicidad

La disminución en la producción de ATP incapacita a las neuronas para la liberación excesiva de neurotransmisores en el espacio extracelular. En la corteza cerebral el glutamato es el principal neurotransmisor excitador. La liberación de grandes cantidades de glutamato en el medio extracelular es el factor determinante de la cascada de los mecanismos fisiopatológicos del ictus. La presencia prolongada de cantidades de glutamato da lugar a una activación excesiva de los receptores de glutamato produciendo un daño excitotóxico: la muerte neuronal se inicia por el exceso de glutamato extracelular y mediada por niveles citotóxico de calcio intracelular. La muerte excitotoxicidad requiere la entrada de Ca^{2+} extracelular. El exceso de Ca^{2+} intracelular libre inicia una serie de eventos moleculares que culminan con la muerte de las neuronas. La excitotoxicidad está actualmente considerada como el más importante iniciador y ejecutor de la muerte neuronal en la isquemia cerebral.

2.8. Fisiopatología cerebral del ictus

El tejido cerebral tiene un consumo de oxígeno y glucosa relativamente alto depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa para producir energía. Al producirse el ictus, la disminución focal del flujo de sangre supone un aporte de O_2 y glucosa insuficiente para mantener los niveles normales de metabolismo oxidativo. Causa una disminución en la producción del ATP y de los depósitos energéticos necesarios para el mantenimiento de los gradientes iónicos en las neuronas situadas en el núcleo el área isquémica, produciéndose, desde los primeros minutos la muerte neuronal. Sin embargo, en la "zona de penumbra", la presencia de una perfusión residual desde vasos sanguíneos colaterales permite que las neuronas mantengan el metabolismo energético parcialmente conservado. Es la posibilidad de actuar sobre estas neuronas para conseguir su

recuperación el centro de estrategias terapéuticas para minimizar el daño de la lesión isquémica.

Estudios en las dos últimas décadas han llevado a cabo a la evidencia de la existencia de una interacción entre el exceso de glutamato extracelular (excitotoxicidad) y la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS) en la generación y progresión de la lesión isquémica.

Las especies de oxígeno reactivas (ROS) son definidas como entidades moleculares sub-productos del metabolismo oxidativo celular normal que son muy tóxicas para las células. Las ROS incluyen tanto radicales libres (contienen electrones no-apareados altamente reactivos) tales como el superóxido ($O_2\cdot^-$), el óxido nítrico ($NO\cdot$) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y otras especies moleculares como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Las células disponen de una variedad de mecanismos para su eliminación. En las células, el flujo de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial produce permanentemente los radicales libres superóxido y peróxido de hidrógeno. Diferentes sistemas enzimáticos antioxidantes celulares como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión (GSH) y catalasa y otras moléculas como la vitamina E y ácido ascórbico, limitan la producción de radicales libres y evitan el daño tisular. En condiciones fisiológicas hay un equilibrio entre los factores que promueven la formación de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidantes. El estrés oxidativo es la condición en la que las defensas antioxidantes celulares son insuficientes para mantener los niveles de ROS por debajo del umbral de toxicidad. Esto puede ser debido a una producción excesiva de ROS, por pérdida de las defensas antioxidantes o por ambos. En una situación de estrés oxidativo, el exceso de ROS puede dañar el DNA, proteínas y lípidos e iniciar reacciones en cadena que lesionan los sistemas de transporte mitocondrial, inducen la actividad de proteasas y aumentan la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y finalmente causan la muerte celular.

El cerebro es particularmente vulnerable a la acción de los radicales libres, ya que factores como; la presencia de niveles bajos de glutatión en las neuronas, el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas neuronales y un requerimiento relativamente elevado de oxígeno debido a la alta actividad metabólica del cerebro, contribuyen a la relativa alta vulnerabilidad del sistema nervioso central al daño oxidativo.

2.8.1. El complejo ferritina-hierro como potenciador del daño cerebral isquémico.

La presencia de niveles elevados de hierro en el cerebro ha sido asociado a patologías neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, ataxia de Friedreich, ictus, etc. El mecanismo neurotóxico propuesto es que la acumulación de hierro intracelular aumenta la formación de radicales libres produciéndose una situación de estrés oxidativo que lleva a la muerte neuronal. El hierro es el metal más abundante en el cerebro principalmente unido a la proteína ferritina y es necesario como co-factor en la síntesis de DNA, RNA y proteínas, en enzimas que participan en la respiración mitocondrial, en la síntesis de neurotransmisores y en la formación de mielina. El hierro en forma libre, no unido a otra molécula, es un potente catalizador de la formación de radicales libres, contribuyendo de manera muy importante al estrés oxidativo. En presencia del ión ferroso (Fe^{2+}) libre, los aniones superóxido y

peróxido de hidrógeno se convierten en radical hidroxilo, capaz de oxidar los componentes lipídicos de las membranas celulares, proteínas y ADN, causando la muerte celular. Sin embargo, hay controversia en si el hierro en concentraciones grandes en el cerebro es un factor casual en la enfermedad o una consecuencia del daño causado por otros factores. ...

La ferritina es una proteína capaz de almacenar alrededor de 4.500 átomos de hierro en forma de hierro férrico (Fe^{3+}) por moléculas. La ferritina mantiene el hierro en forma no reactiva incapaz de participar en reacciones redox y por tanto puede ser un componente clave para proteger el tejido contra el daño oxidativo catalizado por el hierro. Esta capacidad para almacenar hierro en forma estable ha llevado a proponer a la ferritina como parte del sistema antioxidante celular.

La ferritina ha sido considerada como la principal forma de almacenar el hierro por las células. Sin embargo, estudios sobre la forma de liberación del hierro por el sistema mononuclear fagocítico, demuestran que la ferritina, además de su papel como molécula secuestradora del ión Fe^{2+} . También forma parte del metabolismo extracelular del hierro, siendo una de las principales formas de liberación del hierro por el sistema mononuclear fagocítico, actuando de enlace entre el "pool" de hierro intracelular y la transferrina extracelular. Varias moléculas –el radical superóxido, el ácido ascórbico y el óxido nítrico- pueden liberar el hierro desde la ferritina con la formación de un "pool" de hierro reactivo capaz de exacerbar la producción de ROS y aumentar el daño oxidante. Esto hace de la ferritina un potente agente oxidante.

En el ictus, en estudios clínicos realizados en pacientes con ictus agudo, muestran que el mayor deterioro neurológico estaba asociado con niveles altos de ferritina en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo (LCR). En los estudios realizados la media de edad de los pacientes era $67,5 \pm 10,9$ años y los niveles altos de ferritina en plasma y en LCR, apoyaban la hipótesis de que los depósitos elevados de ferritina en el cerebro podían favorecer alguno de los múltiples mecanismos celulares y moleculares que pueden llevar a una mayor necrosis tisular. En un estudio realizado en ratas con sobrecarga de hierro por dietas ricas en hierro –acumulación de hierro en los tejidos y mayores niveles de ferritina plasmática-, el volumen del infarto producido por oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) era 66% mayor que en los animales control. El efecto del hierro aparece asociado con excitotoxicidad y un mayor estrés oxidativo (Gámez y col. 2003). Los resultados confirmaban que el hierro desempeña un papel importante en el daño neurológico que sigue al ictus. Por primera vez se demostraba experimentalmente la existencia de una relación entre el contenido de los depósitos de hierro sistémico y el tamaño de la lesión en el infarto cerebral. Sin embargo, no había diferencias significativas en el contenido de hierro en las diferentes regiones cerebrales entre las ratas con acumulación de hierro en los tejidos y las ratas control. Los mecanismos implicados en la lesión cerebral relacionada con el hierro no parecen asociados a un aumento del contenido de hierro cerebral. Esta característica distingue al ictus de otras patologías neurodegenerativas.

CAPÍTULO 3:

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1. Métodos

Iniciamos la investigación con la obtención, de siete ratas Wistar (Harlam): seis hembras y un macho.

Las muestras serán neuronas de la corteza cerebral, las cuales han sido obtenidas a partir de los embriones de las mismas, después de 16 días de gestación según el protocolo aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) de la Generalitat de Catalunya.

3.1.1. Cultivos primarios de Neuronas

Disección Cerebro

- Desnucamos la rata en el día 16 de gestación, se extraen los embriones colocándolos en una placa con BPS (Dulbeco>100mM) con 0'6% glucosa.
- Cortamos la cabeza, con la ayuda de unas pinzas y con una lupa extraemos los cerebros, todo ello en PBS con 0'6% glucosa enfriando a 4°C.
- Disgregamos y en 2 falcons de 15ml, centrifugamos de 2 a 3 minutos a 800rpm y decantamos el sobrenadante.
- Resuspendemos en 2'7ml de PBG +0'3ml tripsina (SIGMA) 10x lo dejamos 20 min en el baño a 37°C, agitándolo cada 3-5 min.

- Añadimos 1'5ml de NHS y 0'5ml de DNAsa (ROCHE) (0'5mg/ml) 10x lo dejamos 12min a 37°C en el baño.
- Resuspendemos con una pipeta unas 40 veces.
- Centrifugamos 5min a 800rpm.
- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos en 5ml de medio NB (GIBCO) completo.

Cultivo:

- Medio de cultivo: NB de cultivo (100ml)
- Medio NB (1x) (GIBCO)
- Glutamina (0'5mM) (SIGMA)
- Na₂HCO₃ (0'5mM) (PANREAC, Anexes)
- Glucosa 45% (SIGMA)
- Penicilina/Streptomicina (100IV/ml ; 100VG/ml) (SIGMA)
- Glutámico 3'7µg/ml (25µM) solo 4 primeros días. (SIGMA)
- B27 Supplement Minus AO (25µM). (GIBCO)

Se precisa una incubación en placas con Poly-D-lisina (SIGMA) 10µg/ml de poly-D-lisina (SIGMA) durante 2-3horas a 37°C y se retira.

Añadiremos 800Cl de medio de cultivo y 2ml de NB en unas placas especiales para cultivos, durante 12 días.

Tratamientos

A partir del día 16 de la extracción de las células, empezaremos los tratamientos. Prepararemos unos 500ml de cada uno; un control, un glutámico, uno de ferritina y otro de Apoferritina.

Control:

Medio de cultivo: NB de cultivo (100ml)

- Medio NB (1x) (GIBCO)
- Glutamina (0'5mM) (SIGMA)
- Na₂HCO₃ (0'5mM) (PANREAC)
- Glucosa 45% (SIGMA) (Anexe)
- Penicilina/Streptomicina (100IV/ml ; 100VG/ml) (SIGMA)
- B27 Supplement Minus AO (25µM). (GIBCO)

Glutámico:

Medio de cultivo: NB de cultivo (100ml)

- Medio NB (1x) (GIBCO)
- Glutamina (0'5mM) (SIGMA)
- Na₂HCO₃ (0'5mM) (PANREAC)
- Glucosa 45% (SIGMA)
- Penicilina/Streptomicina (100IV/ml ; 100VG/ml) (SIGMA)
- Glutámico 3'7µg/ml (50µM) 2h. (SIGMA)
- B27 Supplement Minus AO (25µM). (GIBCO)

Ferritina:

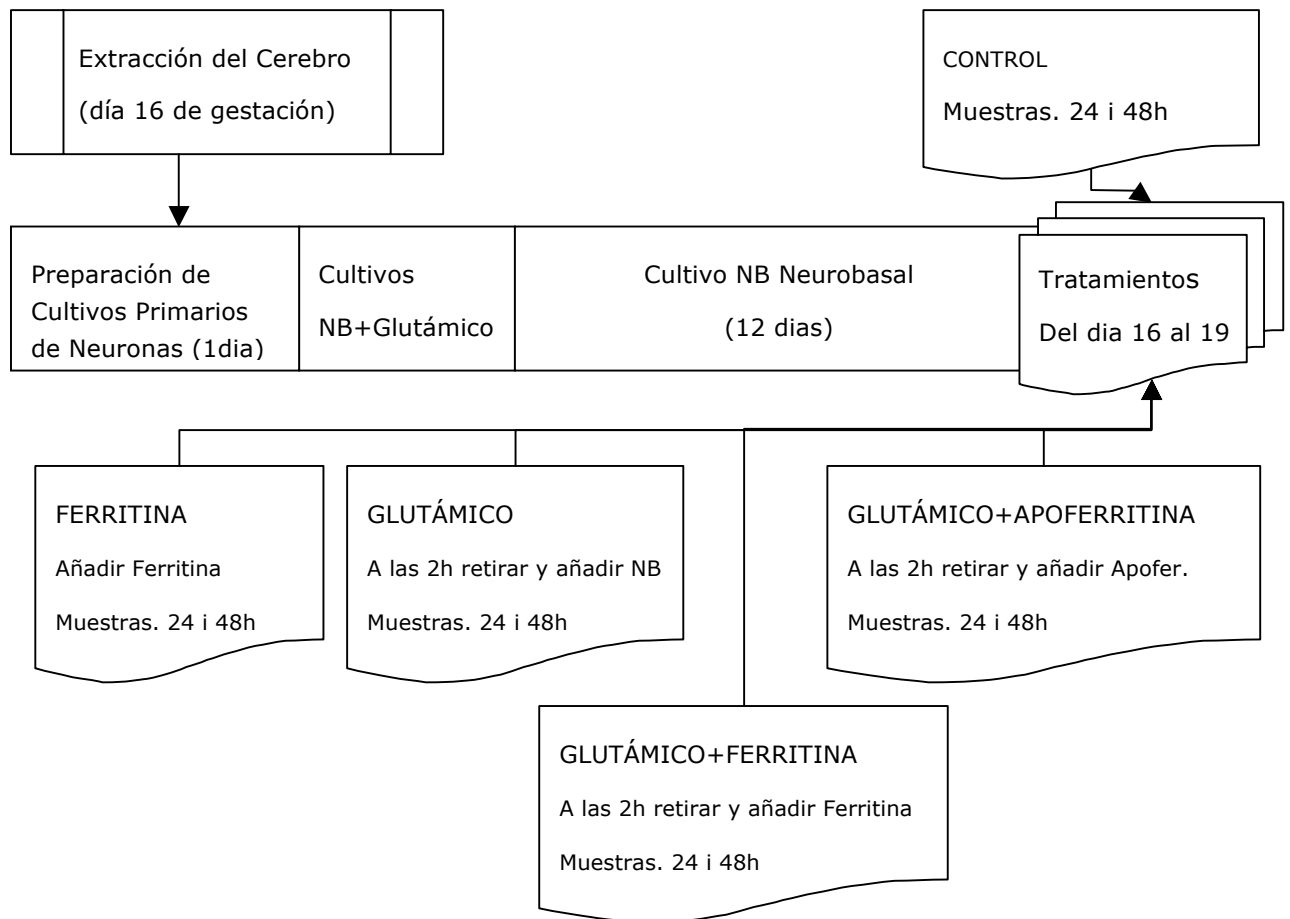
Medio de cultivo: NB de cultivo (100ml)

- Medio NB (1x) (GIBCO)
- Glutamina (0'5mM) (SIGMA)
- Na₂HCO₃ (0'5mM) (PANREAC)
- Glucosa 45% (SIGMA)
- Penicilina/Streptomicina (100IV/ml ; 100VG/ml) (SIGMA)
- Ferritina (100ng/ml) (SIGMA)
- B27 Supplement Minus AO (25µM). (GIBCO)

Apoferritina:

Medio de cultivo: NB de cultivo (100ml)

- Medio NB (1x) (GIBCO)
- Glutamina (0'5mM) (SIGMA)
- Na₂HCO₃ (0'5mM) (PANREAC)
- Glucosa 45% (SIGMA)
- Penicilina/Streptomicina (100IV/ml ; 100VG/ml) (SIGMA)
- Apoferritina (100ng/ml) (SIGMA)
- B27 Supplement Minus AO (25µM). (GIBCO)



Preparación de los Cultivos Primarios de las Células Neuronales

3.1.2. Ensayo Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

LDH (Kit Sigma)

Compuesto de:

- L2402 Lactate dehydrogenasa Assay substrate Solution (SIGMA)
- L2527 Lactate dehydrogenasa Assay Enzyme Preparation (SIGMA)
- L2277 Lactate dehydrogenasa Assay Dye Solution (SIGMA)
- L2152 Lactate dehydrogenasa Assay Lysis solution. (SIGMA)

1. Se Preparan 25ml de Lactate Dehydrogenase Assay Enzyme Preparation añadiendo 25ml de Agua MQ al enzima liofilizado. Se guarda en el congelador en aliquotas.
2. Preparamos Lactate Dehydrogenase Assay Mixture mezclando volúmenes iguales de Lactate Dehydrogenase Assay substrate, enzyme y Dye solutions. (No guardar, preparar y usar).

Se añade la mezcla en un volumen igual $\frac{1}{2}$ el volumen del medio de cultivo.

3. Cubrimos con papel de aluminio y dejamos 20-30 minutos a temperatura ambiente.

4. La reacción puede pararse añadiendo 1/10 volumen de HCl 1N en cada pocillo.
5. Absorbancia a 490.

Medimos a 690 para eliminar ruido y restamos.

3.1.3. Determinación de hierro Libre en fluidos biológicos

*** Preparación de las diluciones estándar del complejo ferroso del Balhophenanthrolina BPS**

- Stock del quelante: 28,2mg BPS en 1ml H₂O desionizada MQ
(Solución 50mM) D3
- Curva Fe: 196mg de sulfato ferroso amónico en 5ml MQ
Solución madre de 1mM Dp → hasta 10 diluciones [0,1-50] μ M

*** Preparación del patrón en placa**

- 48 μ l de las Dp de cada uno
- 2 μ l de BPS (D3)

*** Preparación de la muestra en placa**

- 48 μ l de las Dp de cada uno
- 2 μ l de BPS (D3)

*** Análisis con espectrofotómetro**

Mezclar bien y dejar reposar 15min tapado de la luz.y leer a 535.

3.1.4. Determinación de hierro Total en Cultivos

*** Preparación de los Patrones de dilución Standard de Hierro**

- Se preparan disoluciones 0-300 μ M de FeCl₃ con 10mM HCl
- 0'3mM → 0,81g en 10ml → Dilución madre
- En eppendorf haremos 6 Diluciones: Ds

*** Preparación del patrón en Eppendorf**

- 50 μ l de la solución standard
- 50 μ l tampón lisis
- 50 μ l de mezcla fresca HCl/KMnO₄
- 15 μ l disolución de detección

*** Preparación de la muestra en Eppendorf**

- 50µl de lisado celular
- 50µl de HCl 10mM
- 50µl de mezcla fresca (1:1 en volumen HCl 1,4M y KMnO₄ 4,5% gr/v H₂O).
- Se incuba a 2 horas a 60°C
- Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- Se añade a cada eppendorf 15µl del reactivo de detección de hierro:

Reactivo de detección de hierro: 3-(2-Pyridyl)-5-6-diphenyl-1,2,4, triazina-4,4-disulfonic acid sodium salt.

En 10ml

- | | |
|------------------------|----------|
| - 6,5mM Ferrozina | - 32mg |
| - 6,5mM Neocuproine | - 13,5mg |
| - 2,5M Acetato amonico | - 1,93gr |
| - 1M Ácido ascórbico | - 1,76gr |

*** Análisis con espectrofotómetro**

Pasados 30 minutos se transfiere 140µl a las placas y se lee a 550

3.1.5. Determinación de Proteína

*** Preparación de los patrones de proteína**

- Pesamos 3mg de proteína deshidratada en 10ml de H₂O (300µg/ml) P₃₀₀
- En eppendorf haremos las Diluciones de Proteína 0-300µM:

*** Preparación de las diluciones de las muestras**

Las muestras contienen alta concentración de proteínas y el rango de los patrones es de 0-300µM por lo que tendremos que diluir las muestras:

- Pondremos 2µl de muestra en 98µl de tampón fosfato.

*** Preparación de la muestra en Cubeta**

Añadimos:

- 5µl de muestra
- 245µl Bradford

*** Análisis con espectrofotómetro**

Esperamos 5 minutos (muestra estable entre 5-30 min.) y leemos a 535.

3.2. Preparación de Reactivos

Todos los reactivos empleados serán pesados en una Balanza analítica de cuatro decimales para obtener una alta precisión, ya que trabajamos en cantidades muy pequeñas.

3.2.1. Preparación del Tampón Lisis

- 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 150mM NaCl (PANREAC),
- 1% triton (SIGMA)

Añadimos inhibidor proteasas (SIGMA); Para 10ml

- Leupeptina (5mg/ml) → 10µl
- Aprotinina (5mg/ml) → 10µl
- Iodoina (1M) → 10µl
- Na₃VO₄ (200mM) → 50µl
- DMSF (200mM) → 50µl

3.2.2. Preparación del glutámico 50µM

- Disponemos de una solución madre de Glutámico 2,5 mM,
- Para tenerlo a 50 µM pondremos 1ml en 50 ml de medio NB..

3.2.3. Preparación de la dilución HCl 10mM tenemos 6N

- 10mM de HCl → 200µl a 20ml (300µM FeCl₃ en 10ml)

3.2.4. Preparación del reactivo detección de hierro

Pesaremos para 10ml de reactivo:

- Ferrozina 32mg (Sigma)
- Neocupronina 13,5mg (Sigma)
- Acetato amonio 1,93gr (Panreac)
- Àc. Ascorbico 1,76gr (Panreac)

3.2.5. Preparación de la mezcla fresca

- Mezclar en el momento de usar.
- Preparar 1,4 ml HCl (Panreac) (anexo 2.1.) en 10ml de H₂O MQ y 0,225gr KMnO₄ (Panreac) (anexo 2.4.) en 5ml de H₂O MQ.

3.2.6. *Preparación del tampón lisis o Dilución NaOH 50mM*

- Pesar 0,2gr de NaOH (Panreac) (anexo 2.2.) en 100ml de H₂O MQ.

3.3. Materiales e instalaciones

Las instalaciones disponibles constan de un laboratorio, una sala de manipulación de animales e instalación para cultivos celulares del Departamento de Biotecnología de UPC de Castelldefels. I Las instalaciones donde se ubicaba el estabulario en la UB Biología de Barcelona.

En equipamiento para el cultivo de células se dispone campana de flujo laminar, incubador, microscopio, centrífuga refrigerada.

Y instrumentación: espectrofotómetro microcentrifuga Eppendorf, pipetas automáticas, ordenador, neveras, congelador y resto de material fungible de menor coste.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS

4.1. Toma de muestra Cultivos Primarios

Se toman muestras del medio de cultivo y del lisado

4.1.1. Medio de cultivo

Finalizado los 12 días de incubación, se realizarán los diferentes tratamientos; Control, Glutámico, Glutámico+Ferritina y Glutámico+Apoferritina.

Tendremos rotulados varios eppendorf de 1,5ml con cada tratamiento y con las horas de cultivo.

La toma de muestras será recogida a las 3, 24, 48 y 72 horas, traspasaremos 100µl del contenido de cada pocillo al eppendorf correspondiente.

Guardaremos las muestras en el congelador a -80°C en cubetas(Arcón) para garantizar su conservación hasta que se lleve a cabo los análisis.

Una vez hagamos algún tipo de análisis sacaremos los eppendorf que vayamos a utilizar y los pondremos en una caja con hielo para garantizar una climatización de la muestra a la temperatura ambiente o de trabajo.

4.1.2. Lisado

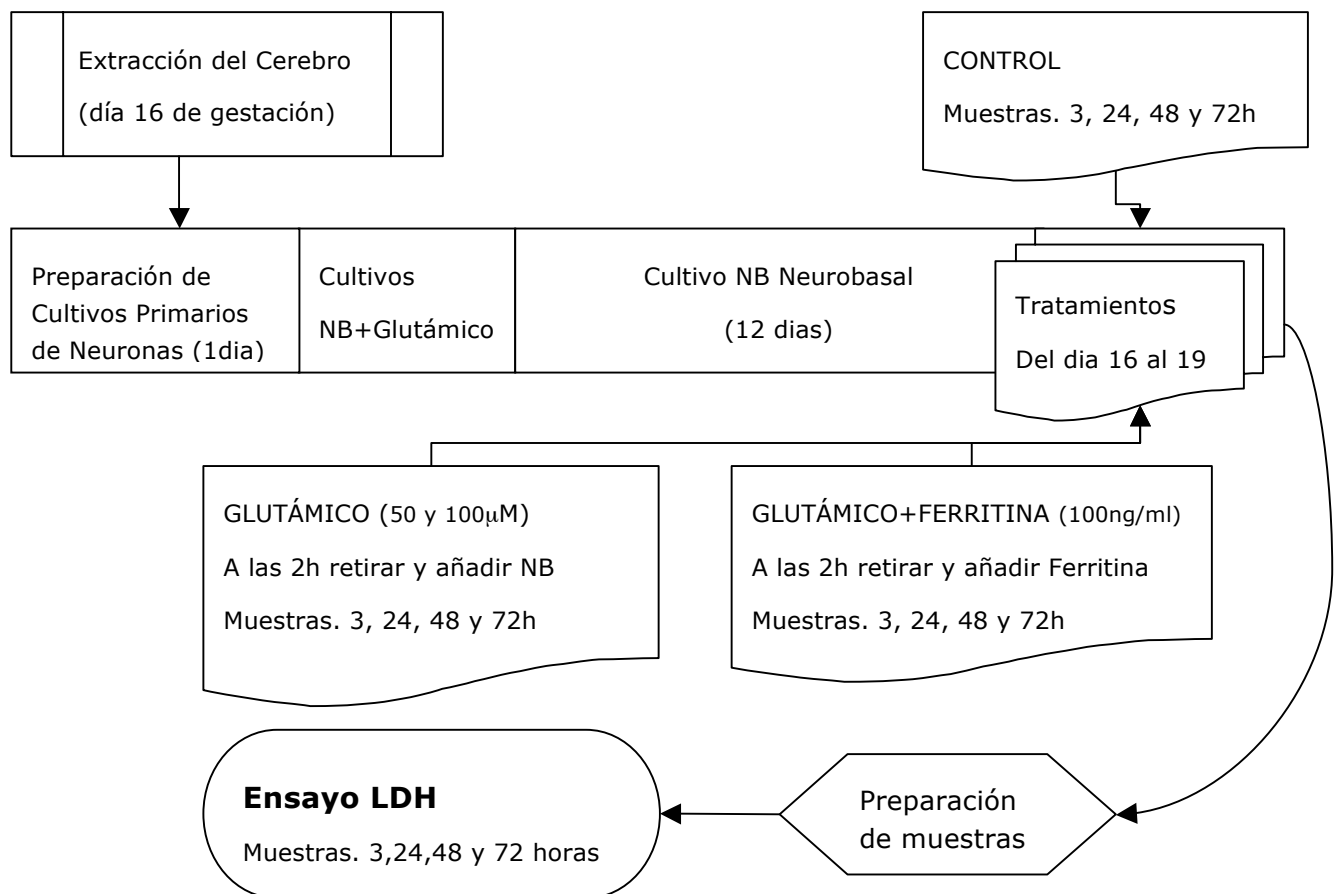
Al finalizar cada tratamiento a las 24, 48 y 72 horas se retira el medio de cultivo sobrante añadiendo 240 µl de tampón lisis, donde destruimos las células, con ligera agitación y manteniéndose en frío.

Pasados 5-10 minutos de contacto con el Tampón Lisis se retira el extracto celular almacenándolo en eppendorf. Estos serán guardados en el congelador a -80°C hasta su posterior análisis.

4.2. Ensayo Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

En el medio de cultivo: la LDH es una enzima citoplasmática que se libera al medio de cultivo cuando se producen daños sobre la membrana plasmática de las células siendo un buen marcador de la integridad de la membrana celular (Cook y Mitchell, 1989)

El ensaño de LDH será una buena referencia para poder contabilizar de alguna manera, la concentración, en células o proteínas, de los diferentes tratamientos y comprobar cual de ellos es más dañino para las neuronas.



Esquema representativo del Ensaño LDH

Queremos comprobar el efecto del hierro sobre el daño cerebral si es en función a la acumulación de hierro en el tejido cerebral.

Sabiendo que el glutámico en su forma ionizada glutamato es el principal neurotransmisor del sistema nervioso y la ferritina es la proteína almacenadora de hierro por excelencia se ha realizado un sondeo de las concentraciones de glutámico y glutámico+ferritina para comprobar el daño provocado en las neuronas y poder caracterizar así las condiciones de neurotoxicidad de glutamato y glutamato+ferritina.

El efecto del glutámico y la ferritina dependerá de la edad de los cultivos, del tiempo de exposición y de la concentración de glutámico presente en el medio de incubación.

El objetivo de este ensaño es determinar la concentración y el tiempo de exposición, del glutámico y del combinado con ferritina adecuados para inducir a las neuronas una situación similar al infarto cerebral.

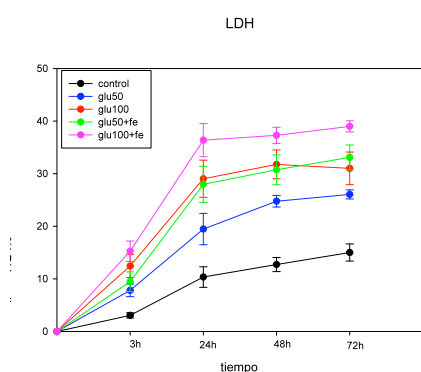


Gráfico LDH. Caracterización neurotoxicidad

El gráfico esta expresado en % LDH en medio respecto al tiempo de exposición. Hemos hecho ensayos LDH para cada tiempo a las 3, 24, 48 y 72 horas en medio de cultivo y en lisado. Observamos que a las 72horas la muerte celular es muy elevada, por lo que, determinaremos como tiempo límite de exposición.

El grafico ha sido representado dividiendo los resultados del ensaño LDH de cada tiempo entre el total (72h+Lisado) dando así, una referencia en % LDH en medio

Todos los resultados se han comparado con los cultivos control que no están tratados con glutámico ni ferritina y dan alrededor de un 10 %LDH.

Las muestras tratadas con glutámico (50 y 100 μ l), como era de esperar influyen en el daño celular dando valores del 25% y el 30% respectivamente.

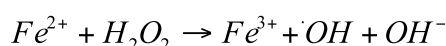
Por otro lado al combinar el neurotransmisor con la proteína se ha observado un aumento considerable del % LDH. Donde la combinación de glutámico50 μ l+ferritina da unos valores muy similares al ensaño con glutámico100 μ l. Obteniendo un 30 % de muerte entre las 24 y 48h.

Los valores resultantes de glutámico100 μ l+ferritina se aproximan al 40% LDH , estos serán omitidos por su alto valor.

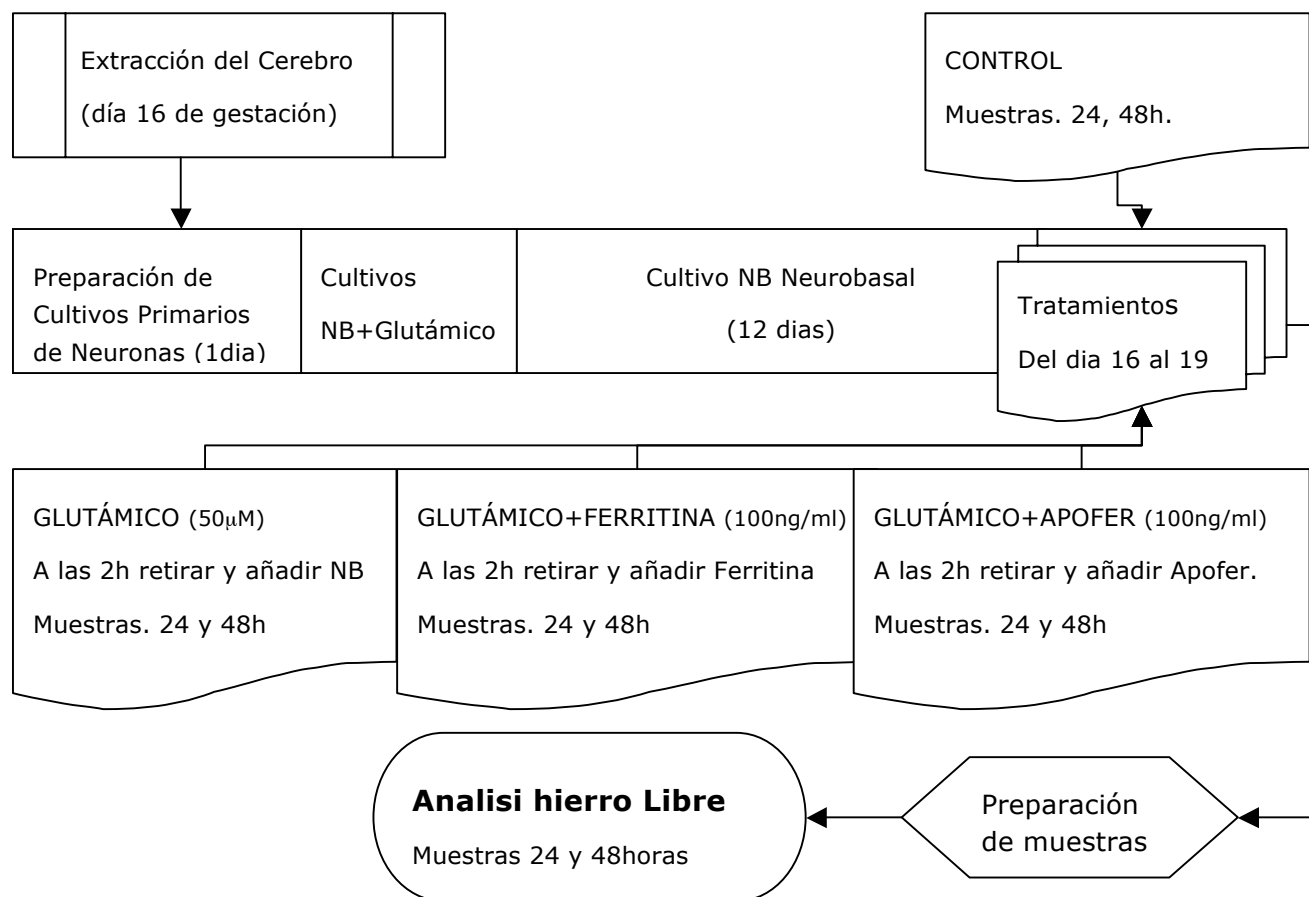
4.3. Determinación de hierro Libre en fluidos biológicos

El hierro como tal, es el metal más abundante en el cerebro principalmente unido a la proteína ferritina, ya que su presencia aislada, es un potente catalizador de la formación de radicales libres y causante del estrés oxidativo.

En presencia del ión ferroso (Fe^{2+}) libre, los iones superóxido y peróxido de hidrógeno se convierten en radical hidroxilo, capaces de oxidar los componentes lipídicos de las membranas celulares, proteínas y ADN, causando la muerte celular. A esta reacción se la llama la reacción de Fenton:



La determinación del hierro libre se analizara a partir de medio de cultivo con los tratamientos de glutámico, glutámico+ Ferritina y glutámico+Apo ferritina



Esquema representativo de la Determinación Hierro Libre

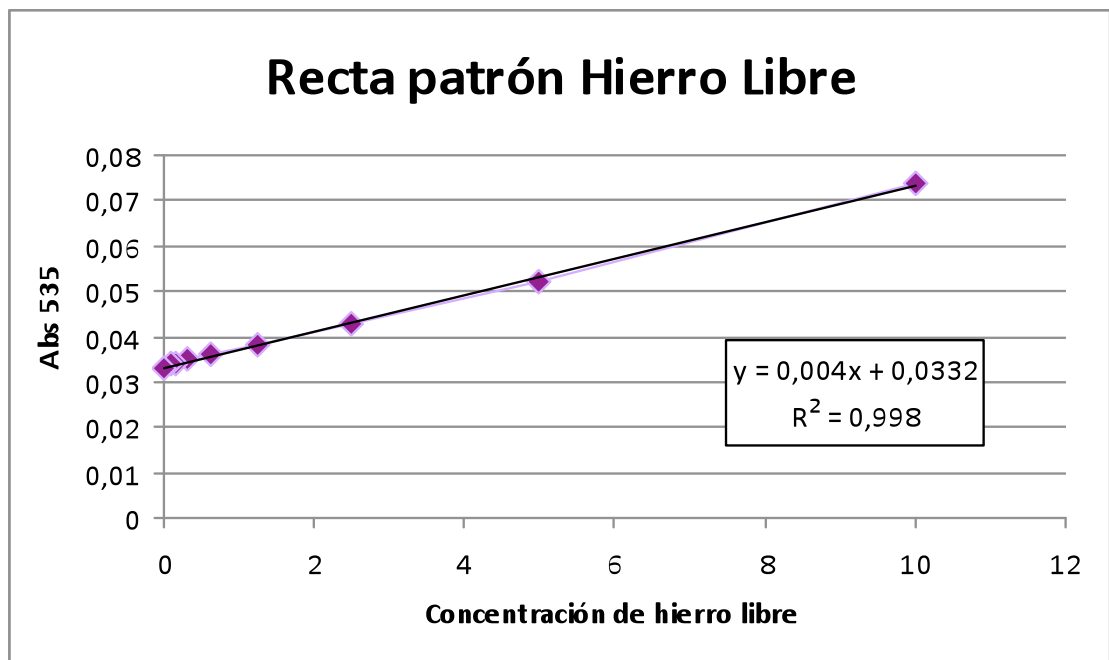


Grafico de recta patrón de hierro libre: Preparado con complejo ferroso de balhophenanthrolina BPS

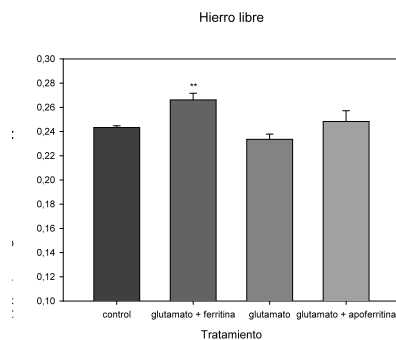


Grafico de los resultados de hierro Libre: Realizado en medio de cultivo con muestras a las 48h

Se ha representado solamente los resultados a las 48h, omitiendo los resultados a las 24h por no ser significativos.

El gráfico de hierro libre esta representado en concentración de hierro/ μ l para cada tratamiento citado en el esquema representativo de este método.

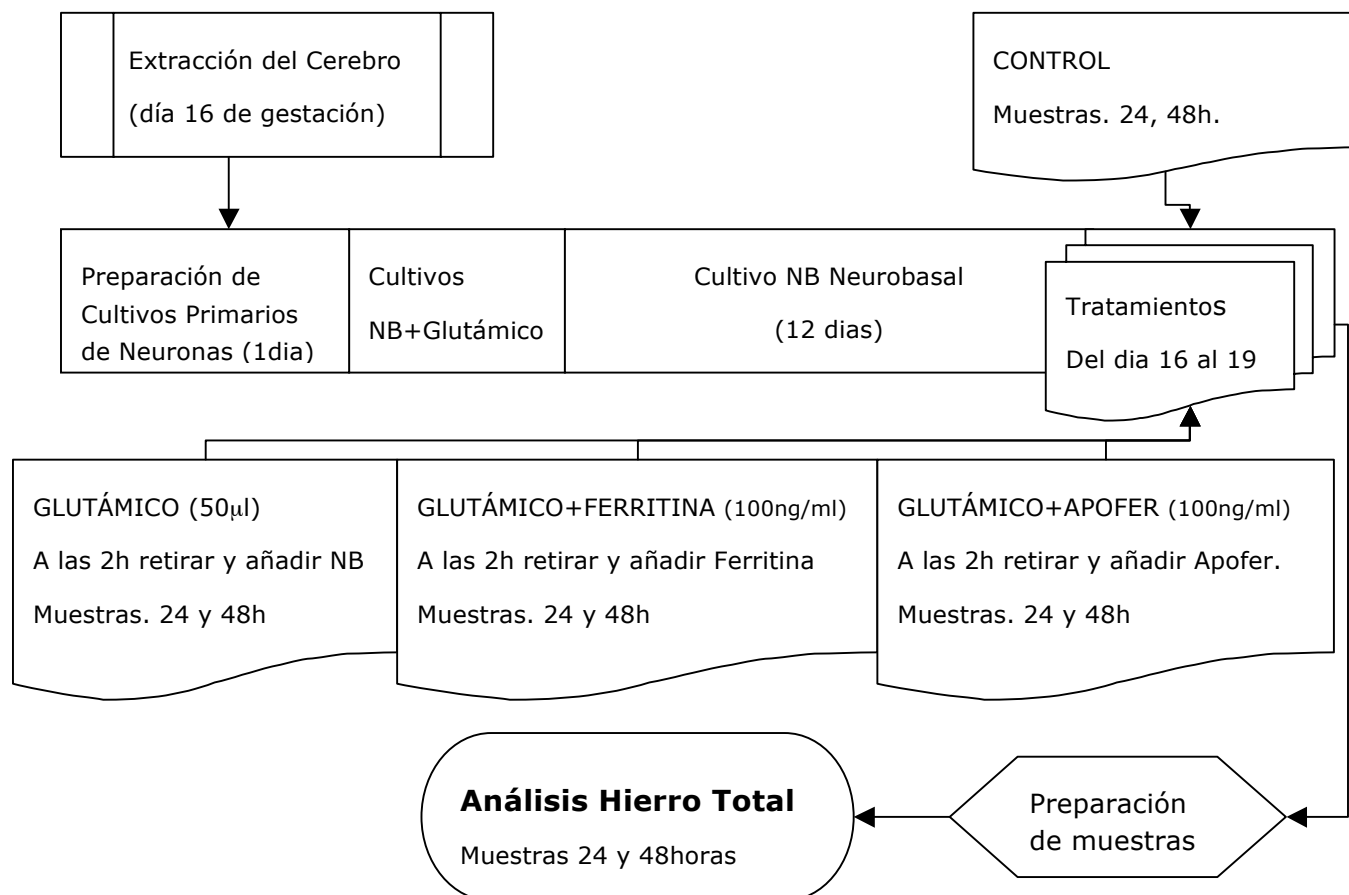
El método estadístico ha sido la de Kruskal-Wallis One Way análisis of Variance on Ranks. Donde la probabilidad es menor 0,01 entre glutamato+ferritina respecto al control.

Los tratamientos de glutamato y glutamato+apoferritina mantienen los mismos niveles de hierro que el control.

4.4. Determinación de hierro Total en Cultivos

Determinación del hierro total en cultivos para los diferentes tratamientos en lisados a las 48 horas.

Para su determinaciones realizara una recta patrón de proteína para poder calcular las concentraciones de proteínas y así, poder estandarizar los valores. También se construirá una recta patrón con una dilución standard de hierro



Esquema representativo de la Determinación de Hierro Total

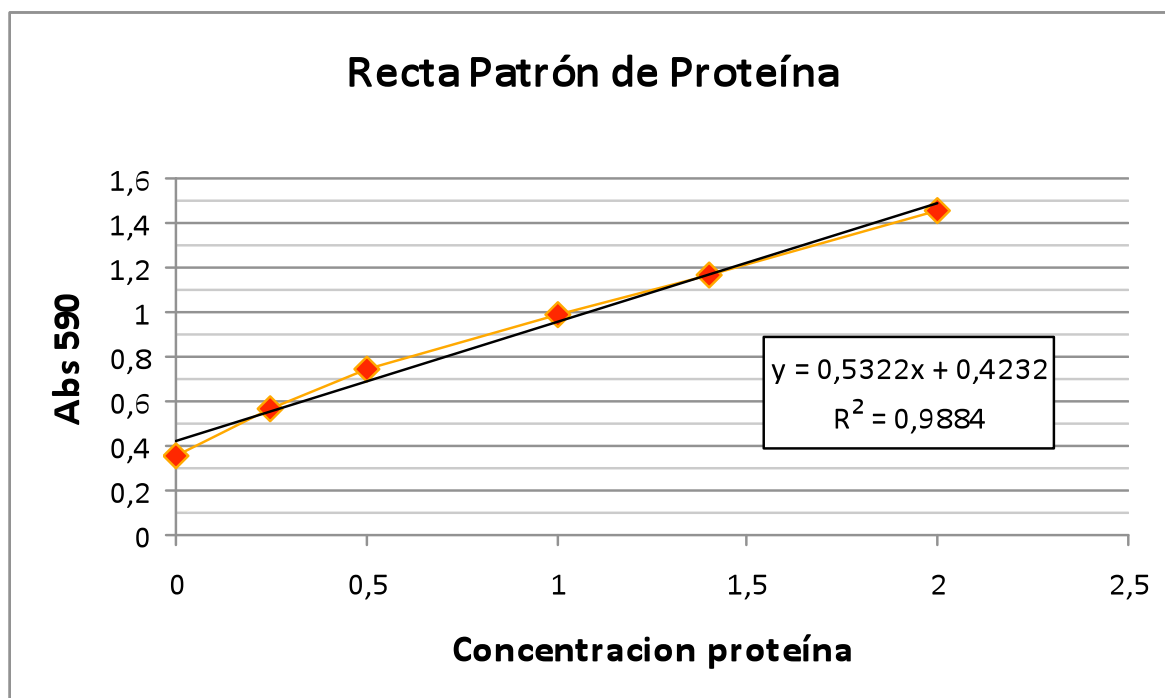


Grafico de recta patrón de Proteínas: Preparado con la proteína deshidratada.

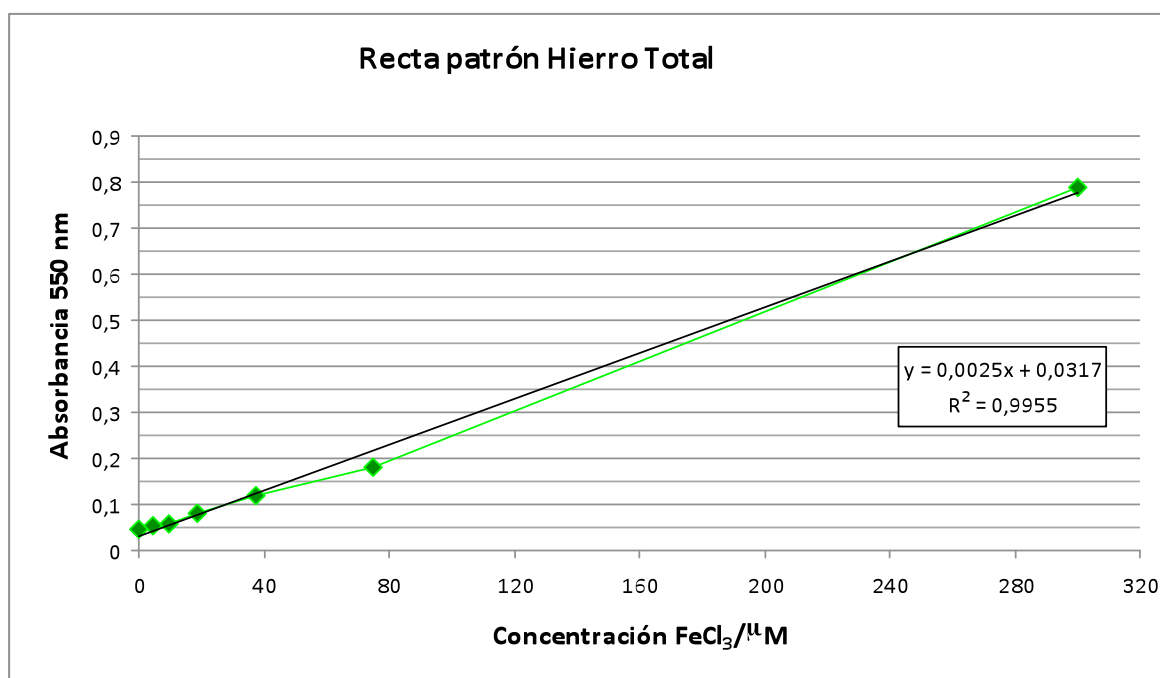


Grafico de recta patrón de Hierro Total: Preparado con la dilución standard de hierro.

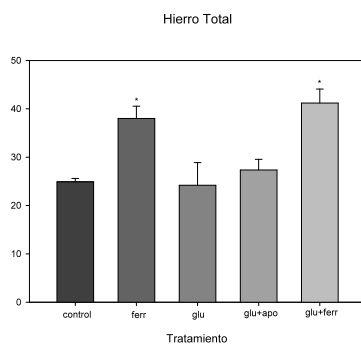


Gráfico de los resultados de Hierro Total: Realizado en medio de cultivo con muestras a las 48h

Tan solo se han expuesto los resultados a las 48h, omitiendo los valores obtenidos a las 24h por no ser significativos.

El gráfico de hierro total esta representado nm de hierro/mg de proteína para cada tratamiento citado en el esquema representativo de este método.

El método estadístico realizado ha sido el DUNN'S METHOD denominado Multiple Comparison Procedures. De una probabilidad menor al 0,05 entre ferritina y glutamato+ferritina respecto al control.

Estos dos tratamientos sobrepasan significativamente (casi el doble) al control y al resto de tratamientos sin ferritina.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

En el grupo, anteriormente se realizaron estudios con ratones, (Artículo) donde se les alimentaba con hierro. Demostrando, que después de provocar una oclusión arterial, los animales que habían sido alimentados con hierro reflejaban un daño cerebral mayor a los ratones control.

Al analizar el hierro en plasma no se observaron diferencias cuando se miraron los niveles de hierro libre a nivel cerebral. Sin embargo sí, se dieron diferencias en la ferritina que era de 5 veces superior en los animales que habían sido alimentados con hierro.

Partiendo de estos resultados se ha estudiado cómo el complejo ferritina-hierro está implicado en el deterioro neuronal.

Según las investigaciones realizadas en este proyecto, hemos podido observar lo siguiente:

- El suministro de cultivo con glutámico en nuestras muestras, aumenta la mortandad celular de las neuronas, siendo significativo en 50 y 100 μm . Al añadir ferritina también comprobamos que afecta en la mortandad.
- Obtenemos resultados de que la adición de ferritina en un medio de cultivo, donde posteriormente se añade glutámico, (simulando así las condiciones de infarto cerebral) si que afecta en la muerte neuronal.
- Los resultados de hierro que se tiene en cultivo demuestran que la adición de ferritina aumenta la cantidad de hierro, tanto a nivel del medio de cultivo como a nivel celular. Este hierro mediante la reacción de Fenton se cree que favorece la producción de radicales libres causantes de la muerte cerebral.

CAPÍTULO 6:

PRESUPUESTO

6.1. Introducción

Para la elaboración de este proyecto se han tenido en cuenta diferentes tipos de coste:

PRESUPUESTO DEL PROYECTO	
1. Coste reactivos y materiales	Euros
a) Material fungible: Reactivos	
- Ratas Wistar	420,00€
- Kit ensaño LDH	250,00€
- Medio de cultivo Neurobasal	60,00€
- Glutamina	25,00€
- Glutámico	24,00€
- Na ₂ HCO ₃	20,00€
- Glucosa	25,00€
- Penicilina/Streptomicina	35,00€
- Suplement Minus AO	60,00€
- BPS Complejo ferroso Balhophenthrolina	20,00€
- PBG Suero fetal	100,00€
- Tripsina	23,00€

- FeCl ₃ Cloruro férrico	50,40€
- HCl Ácido Clorhídrico	26,90€
- KMnO ₄ Permanganato de potasio	29,20€
- NaCl Cloruro sódico	26,80€
- Tritón	71,00€
- Inhibidor proteasa	125,00€
- NaOH Hidróxido de sodio	41,70€
SUBTOTAL	1.433,00€
b) Material inventariable	
- Material quirúrgico	30,00€
- Puntas de micro pipetas	60,00€
- Eppendorfs	60,00€
SUBTOTAL	150.00€
SUBTOTAL COSTE REACTIVOS Y MATERIALES	1.583,00€
2. Coste de servicios	Euros
a) Adquisición de bienes	
- Arcón congelador -80°C	400,00€
- Balanza analítica	30,00€
- Espectrofotómetro	100,00€
- Material de plástico i vidrio	50,00€
- Gastos de estabulación	100,00€
SUBTOTAL	680,00€
b) Contratación de servicios	
- Coste de energía	50,00€
- Coste del agua: de red y MQ	40,00€
SUBTOTAL	90,00€
SUBTOTAL COSTE DE SERVICIOS	770,00€

3. Coste personal	Euros
Director del proyecto 38.000€/año 60 horas realizadas	1.187,50€
Ingeniero Técnico 28.000€/año 1000 horas realizadas	14.583.00€
SUBTOTAL COSTE PERSONAL	15.770,50€
COSTE TOTAL	18.123,50€

